

Efeito dos Taninos da Bolota Na Digestibilidade da Proteína Bruta de Dietas de Porcos Alentejanos de Montanha

Frederico Cancela de Abreu de Melo e Castro

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Zootécnica – Produção Animal

Orientador: - Doutor João Pedro Bengala Freire

Co-Orientador: - Doutora Maria Isabel Soares de Albergaria Ferraz de Oliveira
Mendonça Rato

Júri:

Presidente: - Doutora Luísa Almeida Lima Falcão e Cunha, Professora Associada do
Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: - Doutor João Pedro Bengala Freire, Professor Catedrático do Instituto
Superior de Agronomia da Universidade técnica de Lisboa

- Doutora Arminda da Conceição Coutinho Martins Bruno Soares,
Investigadora Principal do Instituto Superior de Agronomia da Universidade
Técnica de Lisboa

- Doutor Rui Branquinho de Bessa, Professor Auxiliar da Faculdade de
Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa

- Doutora Maria Isabel Soares de Albergaria Ferraz de Oliveira Mendonça
Rato, Investigadora Auxiliar do Instituto de Ciências Agrárias e
Mediterrânicas da Universidade de Évora

Lisboa, 2009

Este trabalho foi realizado com financiamento da FCT no âmbito do projecto POCI/CVT/60411/2004. Instituto de Ciências Agrárias e Mediterrânicas (ICAM), Universidade de Évora.

Agradecimentos

O autor agradece:

Aos pais, por todo o apoio e amizade incondicionais que me proporcionaram desde sempre.

Ao professor Manuel Cancela de Abreu e `Eng. Isabel Ferraz de Oliveira pelo apoio, conhecimentos e amizade ao longo da realização deste trabalho.

Ao professor Bengala Freire pela disponibilidade demonstrada enquanto professor e orientador.

À Eng. Graça Machado e à D. Margarida pela ajuda indispensável no trabalho realizado no laboratório.

Ao Instituto de Ciências Agrárias e Mediterrâneas, Universidade de Évora, pelos meios disponibilizados para a realização do presente trabalho.

Aos professores do Instituto Superior de Agronomia pelos conhecimentos transmitidos durante o curso.

A toda família, mais concretamente ao tio Manuel, à tia Teresa e aos primos que facilitaram de forma decisiva a integração em Évora.

Aos amigos, em particular à Filipa Tomás, ao António Figueiredo, ao João Ferreira, ao Tomás Lino, Pedro Sá e José Diogo Manoel, porque, cada um de sua forma e na sua altura, nas mais diversas ocasiões sempre me apoiaram.

Aos meus colegas e amigos, particularmente à Filipa Sacadura, sem os quais o percurso académico seria mais complicado.

E a todos os outros que não posso mencionei um muito obrigado!

Resumo

Na engorda de porcos Alentejanos em montanha a bolota é o principal recurso alimentar sendo a erva também um recurso a considerar. Contudo, pouco se sabe sobre a sua utilização digestiva e ingestão por parte dos porcos Alentejanos.

Com este trabalho pretendemos estudar os efeitos dos taninos da bolota na digestibilidade da proteína bruta (PB) da dieta e o papel que a ingestão de erva tem na atenuação destes.

Para tal realizámos ensaios *in vitro*, para determinar o efeito dos taninos e de fontes de proteínas diferentes (gramíneas ou leguminosas), sobre a digestibilidade da proteína. Também foi realizado outro ensaio com porcos Alentejanos a consumir bolota, em pastoreio para testar o efeito da pastagem (gramíneas ou leguminosas) e do tratamento da bolota com polietilenoglicol (PEG) (factorial 2x2) na ingestão de erva e na utilização digestiva da dieta.

Foi possível verificar que os taninos da bolota têm um efeito negativo sobre a digestibilidade real e aparente da proteína (aumentou 17% e 20%, respectivamente, com a adição de PEG).

A ingestão média de bolota foi de 2,9kgMO/dia, havendo uma tendência para maior ingestão de erva nas pastagens de azevém, que, no entanto, não contribuiu para um aumento da ingestão de PB, nem da sua digestibilidade, que foi sempre negativa.

Palavras Chave: Porco Alentejano; Digestibilidade; Proteína Bruta; Taninos; PEG; Bolota

Abstract

During the fattening period of Alentejano pigs in the montanha system, acorns are the main feed resource, however pasture is recognized to have also an important role. Although acorns and pasture have been extensively studied, there is very little information about their intake and digestive utilization by Alentejano pigs.

The present work aims to study the effect of acorn tannins on crude protein (CP) digestibility and the role of pasture intake on the alleviation of the effects of acorn tannins on diet digestibility.

The effect of acorn tannins on the digestibility of different sources of protein was evaluated using an *in vitro* protein digestibility assay. An *in vivo* assay with Alentejano pigs consuming acorn and pasture was carried out to evaluate the effect of pasture type (*Lolium westerwoldicum* or *Trifolium incarnatum*) and polyethylene glycol treatment of acorns (2x2 factorial design) on pasture intake and diet digestibility.

Acorn tannins had a negative effect on apparent and true CP digestibility (about 20% with PEG addition).

Intake of acorns was, on average 2,9kgOM/day. Pasture intake tended to be higher in the *Lolium westerwoldicum* pastures, however this higher grass intake didn't contribute to a higher CP intake or digestibility.

Key words: Alentejano pigs; Digestibility; Crude Protein; Tannins; PEG; Acorn

Abstract

The utilization of oak forest known as “Montado” by finishing Alentejano pigs, is probably one of the most balanced uses that can be made of that system, without prejudice of the forest and with a real increase of its revenue.

During the fattening period of Alentejano pigs in the montanheira system, acorns are the main feed resource, however pasture is recognized to have also an important role. Although the chemical composition of the main feed resources in the montanheira system has already been focused in a lot of studies, however there is very little information about their intake and digestive utilization by Alentejano pigs.

The importance of pasture as a nutrient source or as a protein source to alleviate the antinutritional effects of tannins from acorns is another aspect that is not quantified. The present work aims to study the effect of acorn tannins on the crude protein (CP) digestibility of the diet (acorns and pasture) and the role of pasture intake on the alleviation of the effects of acorn tannins.

To do so, *in vitro* digestibility assays were carried out to evaluate the effect of acorn tannins and the effect of different sources of protein (*Lolium westerwoldicum* or *Trifolium incarnatum*) on protein digestibility. Also an experiment with Alentejano pigs grazing on a pasture (either *Lolium westerwoldicum* or *Trifolium incarnatum*) and consuming acorns was carried out to evaluate the intake of pasture and its effect on diet digestibility. On both, *in vitro* and *in vivo*, assays a treatment with polyethylene glycol (PEG) (a strong complexing agent for tannins) was used to be able to evaluate the potential protein digestibility of mixtures of acorns and pasture. On the *in vivo* assay a 2x2 experimental design was used with two pastures (*Lolium westerwoldicum* and *Trifolium incarnatum*) and acorn untreated or treated with PEG. Acorns were distributed *ad libitum* to the animals and the refusals collected. Pasture intake and diet composition were estimated using the n-alkane technique developed by Mayes *et al.*, (1986) and modified by Dove and Mayes (2006). Diet composition was estimated using the software “Eatwhat” (Dove and Moore, 1996).

Tannins from acorns had a negative effect on the apparent and true protein digestibility. When acorns were treated with PEG, the apparent and true protein digestibility increased significantly (17 and 20 percent units respectively). In the *in vitro* digestibility assay it could be observed that, although protein content of acorns was

low, there was a relatively high percentage of protein (69%) that was not inactivated by tannins.

Intake of acorns was on average 2,9Kg OM/day and it was not affected by either pasture type or PEG treatment. Intake of pasture was on average 213g OM/day and was slightly higher on lolium pasture (305g OM/day) than that on trifolium pasture (120g OM/day). Pasture intake did not contribute to an increase on CP intake or digestibility. CP digestibility was negative in all treatments (-4,22%, -40,95%, -11,6% e -16,19% for lolium and acorns with and without PEG and for trifolium and acorns with and without PEG respectively).

The animals were in a positive balance for energy and negative for protein due to the high intake of acorns, which are rich in starch and poor in nitrogen compounds. This feeding situation favors greatly fat deposition in contrast to low, or no muscular development, which is a common situation in montanha system.

Índice

Agradecimentos.....	- 1 -
Resumo.....	- 2 -
Abstract (máx. 200 words).....	- 3 -
Abstract (max. 1000 words).....	- 4 -
Lista de Quadros e Figuras.....	- 9 -
Lista de Abreviaturas.....	- 11 -

I Introdução.....	1
--------------------------	----------

II Estudo Bibliográfico.....	2
1) A montanha.....	2
2) Bolota e erva.....	2
• Produtos.....	3
• Crescimento.....	3
• Pontos críticos do sistema de montanha.....	4
3) Os taninos.....	4
• Prolina.....	6
• Formação de iões complexos.....	6
• Inactivação de enzimas digestivas.....	8
4) O porco Alentejano.....	8
• Interacção animal/sistema.....	9
5) Utilização de técnicas <i>in vitro</i> para determinação do efeito dos taninos do miolo da bolota sobre a digestibilidade das proteínas alimentares.....	10
6) Estimativa de ingestão e digestibilidade.....	11
• Estimativa da produção fecal.....	11
• Estimativa de digestibilidade.....	12
• N – alcanos como marcador interno.....	13
• Estimativa da composição da dieta.....	14

III Material e Métodos.....	16
1) Método da difusão radial.....	16

2) Efeito do PEG e da proteína do azevém ou do trevo encarnado na digestibilidade <i>in vitro</i> de misturas de Bolota.....	19
• Alimentos utilizados e sua análise.....	19
• Determinação da digestibilidade <i>in vitro</i>	20
3) Efeito da composição da pastagem e da bolota tratada com PEG na digestibilidade da proteína da dieta de porcos Alentejanos.....	21
4) Análise estatística.....	24
• Ensaio <i>in vitro</i>	24
• Ensaio <i>in vivo</i>	24
IV Resultados e Discussão.....	25
1) Teor em taninos da bolota.....	25
2) Efeito do PEG e da proteína do azevém ou do trevo encarnado na digestibilidade <i>in vitro</i> de misturas de Bolota.....	25
• Composição Química dos alimentos utilizados.....	25
• Estimativa de digestibilidade <i>in vitro</i> de bolota pura com adição de quantidades crescentes de PEG.....	26
• Estimativa de digestibilidade <i>in vitro</i> de misturas de bolota com azevém.....	28
• Estimativa de digestibilidade <i>in vitro</i> de misturas de bolota com trevo.....	30
• Comparação entre as estimativas de digestibilidade <i>in vitro</i> entre misturas de bolota com azevém ou com trevo.....	31
3) Efeito da composição da pastagem e da bolota tratada com PEG na digestibilidade da proteína da dieta de porcos Alentejanos.....	33
• Composição química dos alimentos utilizados.....	33
• Composição dos alimentos em n-alcanos.....	34

<ul style="list-style-type: none"> • Ingestão, produção fecal e digestibilidade da dieta (bolota e erva) ingerida por porcos Alentejanos (ensaio <i>in vivo</i>)..... 	35
4) Comparação entre a estimativa de digestibilidade da proteína bruta <i>in vitro</i> e a digestibilidade da proteína bruta calculada no ensaio <i>in vivo</i>	49
V Conclusões.....	41
VI Referências Bibliográficas.....	43
VII Anexos.....	52

Lista de Quadros e Figuras

Tabela 1 – Composição química da bolota (% de Matéria Seca).....	3
Tabela 2 – Volumes de ácido tânico e solução de acetona/água(70:30) utilizados para preparar os padrões de Ácido tânico.....	18
Tabela 3 – Misturas de miolo de bolota e azevém ou trevo para ensaio de digestibilidade <i>in vitro</i>	21
Tabela 4 – Teor de taninos da bolota utilizada no ensaio <i>in vitro</i> medidos como equivalentes de ácido tânico.....	25
Tabela 5 – Composição química dos alimentos utilizados no ensaio <i>in vitro</i>	26
Tabela 6 – Quantidades de bolota e PEG utilizados e respectiva digestibilidade <i>in vitro</i> de PB (média \pm desvio padrão).....	27
Tabela 7 – Quantidades de bolota e azevém utilizados para este ensaio e respectiva digestibilidade <i>in vitro</i> da PB (média \pm dp)....	28
Tabela 8 – Quantidades de bolota e azevém utilizados para este ensaio e respectiva digestibilidade <i>in vitro</i> da PB (média \pm dp)....	30
Tabela 9 – Composição química dos alimentos utilizados no ensaio <i>in vivo</i>	33
Tabela 10 – Composição em n-alcanos da bolota.....	34
Tabela 11 – Composição em n-alcanos da erva.....	35

Tabela 12 – Ingestão e digestibilidade da MO e PB (média \pmdesvio padrão) dos animais alimentados com bolota tratada e não tratada com PEG e com acesso a duas pastagens diferentes.....	36
Figura 1 – Aspecto de uma placa após a realização do método da difusão radial.....	17
Figura 2 – Curva padrão do ácido tânico – Método da Difusão Radial.....	18
Figura 3 – Evolução da digestibilidade da PB da bolota com adição de solução de PEG	27
Figura 4 – Evolução da digestibilidade da proteína bruta da bolota com adição de azevém	39
Figura 5 – Evolução da digestibilidade da proteína bruta da bolota com adição de trevo.....	30
Figura 6 – Comparação entre a evolução da digestibilidade da proteína bruta da bolota com adição de azevém ou trevo.....	31
Figura 7 – Digestibilidade da proteína bruta consoante o tratamento	38

Lista de Abreviaturas

PEG – Polietilenoglicol

MS – Matéria Seca

PB – Proteína Bruta

FB – Fibra Bruta

BSA – Albumina do Soro de Bovino

ADF – Fibra Solúvel em Detergente Ácido

PT – Pastagem de Trevo

PA – Pastagem de Azevém

I – Ingestão

PF – Produção Fecal

Dig - Digestibilidade

D – Dose Fornecida

C – Concentração

NDF – Fibra Insolúvel em Detergente Neutro

MO – Matéria Orgânica

i – ingerido

E(e) – Excretado

a – alimento

x – alimento marcado

s – suplemento

r – refugo

RF – Recuperação Fecal

MS i – Teor em Matéria Seca determinada após liofilização

MS r – Teor em Matéria Seca residual

Q – Quantidade

I. Introdução

Se a composição química dos principais recursos alimentares do montado (erva e bolota) tem sido amplamente estudada, existe uma lacuna de conhecimento relativo à sua ingestão e digestibilidade devido à falta de metodologias testadas para a sua medição em porcos. A importância da erva como fonte de nutrientes e/ou como factor de neutralização dos efeitos tóxicos dos taninos da bolota, é outro aspecto que não está quantificado. Um melhor conhecimento da importância da erva no equilíbrio nutricional do animal e da ingestão, composição da dieta e digestibilidade, poderá permitir uma utilização mais racional dos recursos alimentares naturais contribuindo para a optimização do sistema de produção do porco Alentejano.

Com o presente trabalho pretendemos estudar o poder complexante dos taninos do miolo da bolota com a proteína da dieta através do seu efeito sobre a digestibilidade, real e aparente, da proteína bruta. Também foi nosso objectivo determinar o efeito de quantidades crescentes de PB na dieta e qual seria o nível que permitiria obter uma digestibilidade da proteína bruta semelhante à obtida com a adição de polietilenoglicol (PEG) como substância inactivante do efeito dos taninos. Os parâmetros acima descritos foram estudados em ensaios de determinação da digestibilidade *in vitro* da proteína bruta contida na mistura de uma certa quantidade de miolo de bolota com quantidades crescentes de PEG, azevém ou de trevo encarnado. Com os valores obtidos foram calculadas curvas de regressão e determinado o ponto a partir do qual já não se conseguia um aumento significativo da digestibilidade da proteína bruta.

Um dos nossos principais objectivos foi também estudar as relações existentes entre a quantidade e a natureza (gramíneas ou leguminosas) de erva ingerida por porcos alimentados com bolota e em pastoreio e a ingestão de proteína e digestibilidade da matéria orgânica e proteína bruta. Os resultados das estimativas de digestibilidade *in vitro* foram ainda comparados com dados obtidos no ensaio *in vivo*.

II. Estudo Bibliográfico

1) A montanha

O sistema de produção extensivo designado por montanha compreende uma vertente vegetal e uma vertente animal. A vertente vegetal é constituída pelo montado, característico da Península Ibérica, onde existe o predomínio de uma flora arbustiva alta, e que corresponde a um sistema extensivo de utilização das terras do tipo agro-silvo-pastoril onde há a predominância de duas espécies de árvores, a azinheira (*Quercus rotundifolia*) e o sobreiro (*Quercus suber*) e de pastagem natural ou semeada. Esta, juntamente com a bolota, serve de alimento não só aos porcos Alentejanos como também às outras espécies animais, principalmente ruminantes, que beneficiam das condições proporcionadas por este sistema. O porco Alentejano faz um bom aproveitamento dos recursos que abundam durante o Outono e o Inverno, em especial a bolota. Nas restantes alturas do ano, os montados são utilizados para o pastoreio sobretudo de pequenos ruminantes. Na Primavera há grande disponibilidade de pastagens, geralmente de boa qualidade, enquanto que no Verão a escassez e a má qualidade da pastagem obriga ao fornecimento de suplementos. A utilização dos montados por mais de uma espécie animal é indispensável para, face à actual realidade económica, viabilizar a exploração (Tirapicos-Nunes, 2005).

A constante desflorestação destas zonas, quer por corte quer por morte dos Sobreiros e Azinheiras, aliada ao lento crescimento das espécies vegetais que a compõem, tem levado ao seu progressivo desaparecimento. É de ressaltar que a crescente procura dos produtos de porco Alentejano, principal espécie que dele usufrui, e que possuem algumas características de grande qualidade, muito devido às características do próprio sistema, é um dos principais motivos pelos quais este sistema se vai mantendo (Sanz e Olmo, 2000).

2) Bolota e erva

Segundo Sanz e Olmo (2000), durante a época da montanha o principal alimento presente é a bolota, havendo também erva. No entanto os animais, em geral, não aproveitam a bolota na sua íntegra, ingerindo o miolo e desprezando a casca, que é a parte mais fibrosa (Garcia, 1982; Benito 1996), consumindo 6 a 10 Kg/dia de bolota para 1 a 1,5 Kg/dia de erva, segundo Dobao, *et al*, (1988), ou cerca de 6Kg/dia de bolota para 1,8 a 2,2Kg/dia de erva, segundo Rodriguez-Estévez *et al* (2008), o que

conduz a uma elevada taxa de crescimento e alta deposição de lípidos (Mayoral, 1994).

Segundo Almeida (1986) as principais características são apresentadas de seguida na tabela 1:

Tabela1 – Composição química da bolota (% na Matéria Seca)

Fruto	MS (%)	PB (% na MS)	FB (% na MS)	Teor em Taninos (g/100gMS)	Amido (% na MS)
<i>Quercus ilex</i>					
Inteira	90	4	6-12	-	38-40
Miolo		5-6,5	4-7	-	42-47
<i>Quercus suber</i>	86,5	5,7	5	4,03	-

Fonte: Almeida, 1986

Como se pode verificar pela tabela 1, é importante salientar o baixo teor de proteína bruta da bolota, ao contrário do teor em amido que se apresenta extremamente elevado. Por outro lado a presença de taninos é um dos factores mais importantes quando a bolota é ingrediente essencial na alimentação animal, sendo até, durante a montanha, o principal alimento da dieta de porcos alentejanos.

- Produtos

É de notar que estamos a falar de animais monogástricos, daí que a gordura depositada é muito parecida com a presente no alimento, neste caso da bolota, que é uma gordura muito rica em ácido oleico e mais pobre em ácidos linoleico e saturados (Sanz e Olmo, 2000) que, juntamente com as características genéticas dos próprios animais, ajudam a explicar as características e sucesso da carne proveniente dos animais criados neste meio (Lopez-Bote, 1998). Segundo Tirapicos-Nunes (2005), é a fase de acabamento que tem maior importância na identidade e na qualidade tanto dos produtos frescos como dos transformados. A bolota é bastante pobre em matéria azotada podendo a erva desempenhar um papel importante na satisfação das necessidades dos animais em proteína (Lopez-Bote, 1998).

- Crescimento

Utiliza-se a sazonalidade bastante marcada na disponibilidade da bolota, bem como o cuidadoso controlo da evolução do peso do animal, por forma a não ter demasiado peso à entrada da montanha, a fim de tirar partido do crescimento

compensatório. O ideal é que o animal atinja os 100kg ao fim dum ano e o peso ideal de abate (por volta dos 150kg) ao fim de aproximadamente 15 meses (Buxadé, 1984).

No entanto, nos dias de hoje, a disponibilidade de alimentos que se podem utilizar como suplementos na altura de maior escassez de alimentos da exploração, nomeadamente na Primavera e no Verão, bem como a possibilidade de fazer cruzamentos com outras raças um pouco mais seleccionadas, permitem obter crescimentos mais rápidos, reduzindo assim, tanto a quantidade de gordura na carcaça, como o tempo necessário para obter o peso considerado ideal para abate (Sanz e Olmo, 2000).

- Pontos críticos do sistema de montanha

Um dos pontos críticos do sistema de montanha prende-se com a determinação do encabeçamento de forma a manter este sistema equilibrado, isto é, de forma a aproveitar o máximo de recursos disponíveis não correndo o risco da bolota acabar antes dos animais atingirem o peso pretendido (Lopez-Bote, 1998). Por outro lado é também importante ter em conta que os alimentos utilizados no sistema de montanha, concretamente bolota e erva, são, como é por demais evidente, bastante diferentes daqueles que são usualmente utilizados nas explorações intensivas de porcos brancos. Uma das características importantes da bolota é a quantidade de taninos que contem, que são muito superiores aos dos alimentos usuais (Morales *et al*, 2003) e que podem ser responsáveis por alguns efeitos anti-nutritivos. É frequente os porqueiros e produtores referirem que em anos de Outono seco, em que a quantidade de erva disponível é muito baixa ou inexistente, os animais não crescem e chegam a surgir sintomas de toxicidade, atribuindo este efeitos aos taninos da bolota.

3) Os taninos

Existem várias definições de taninos, e segundo Mole e Waterman (1995) e Harborne (1991) podemos definir os taninos como compostos fenólicos naturais disseminados por variadíssimas espécies vegetais, solúveis em água e com capacidade para formar fortes complexos insolúveis com a proteína ou outros nutrientes em solução aquosa, podendo ter efeitos anti-nutritivos nos animais. Estes compostos têm, recentemente, vindo a ser objecto de estudo devido as características antioxidantes que parecem apresentar (Cai *et al*, 2006). Encontram-se presentes em muitos alimentos utilizados na alimentação animal, com peso molecular e número de

grupos hidroxilos suficientemente elevados para formarem ligações com proteínas e outras moléculas.

O objectivo de estudo destes compostos varia consoante a área do investigador, assim, para um químico interessa o estudo da capacidade complexante destes compostos com as proteínas, para o enólogo é a adstringência que interessa, o nutricionista animal debruçar-se-á sobre os seus efeitos anti-nutricionais abaixo descritos, enquanto que para o agrónomo será importante arranjar um compromisso entre o rápido crescimento das espécies vegetais e a maior susceptibilidade a pragas e doenças por parte das plantas seleccionadas para apresentarem baixos teores de taninos (Mole e Waterman, 1995).

Existem dois grandes grupos de taninos, os condensados e os hidrolizáveis, sendo diferenciados pela sua estrutura e reactividade com agentes hidrolíticos (Haslam, 1966). No que diz respeito aos taninos hidrolisáveis, estes possuem um núcleo composto por um álcool polihidrico que esterifica ácidos polifenólicos que o envolvem. Como se pode depreender pelo nome atribuído, são facilmente hidrolizáveis tanto por ácidos, como por bases, ou até mesmo certas enzimas (Price e Butler, 1980). Este tipo de taninos pode ser encontrado, por exemplo, na bolota. Quanto aos taninos condensados, são polímeros de flavan-3-óis ou flavan-3,4-óis e o seu tratamento com ácido promove a sua condensação ou hidrólise e formação de antocianinas (Haslam, 1977). Na uva e no grão de sorgo podem-se encontrar este tipo de taninos.

Quanto aos efeitos anti-nutricionais destes compostos prendem-se com o facto de reduzir a palatabilidade, deprimirem a ingestão, afectarem a digestibilidade complexando-se com proteína e outros componentes alimentares, com enzimas digestivas e com proteína endógena de alta qualidade, impedindo a sua reabsorção. Podem ainda complexar-se ou danificar partes do tubo digestivo ou provocar intoxicação por absorção dos produtos da sua hidrólise (Almeida, 1986). A afinidade para a proteína aumenta dos pesos moleculares mais baixos (576) para os mais elevados (1134) (Bate-Smith, 1973), no entanto, no que diz respeito aos taninos condensados, quando o peso molecular é extremamente elevado estes apresentam-se pouco solúveis, logo, com pouca capacidade tanante ou adstringente. Segundo Almeida (1986) esta capacidade é máxima perto do ponto isoeléctrico da proteína em questão, confirmando os trabalhos de Hagerman e Butler (1981), Martin *et al* (1985) e Martínez e Moyano (2003). Neste último trabalho foi verificado que para certos pHs a solubilidade das proteínas aumentava após se complexarem e dissociarem do ácido

tânico, atribuindo, os autores, este aumento de solubilidade ao rompimento das pontes de hidrogénio aquando da dissociação.

No seu trabalho publicado em 2003 Martínes e Moyano confirmaram aquilo que Martin e Martin já tinham referido em 1983, ou seja, que pequenas quantidades de ácido tânico tem a capacidade de complexar uma quantidade bastante elevada de BSA (Albumina do Soro de Bovino), uma proteína de referencia, sendo que estes últimos avançam mesmo com um rácio de 1:5, ou seja, quando em presença desta proteína, o ácido tânico tem capacidade de complexar 5 vezes o seu peso.

- Prolina

Quanto mais elevado for o teor em prolina da proteína maior será a capacidade de se complexar com os taninos (Hagerman e Butler, 1981; Mehansho *et al*, 1987). De resto, o alto teor de prolina presente na proteína salivar de alguns mamíferos pode ser considerado um processo de inactivação, já que reduz a quantidade de taninos disponíveis para se complexarem com os nutrientes, reduzindo, assim, os seus efeitos anti-nutricionais (Austin *et al*, 1989).

Como Hagerman e Butler (1981) verificaram, uma proteína que apresente alta afinidade para os taninos complexa-se mais facilmente com estes, mesmo que, proporcionalmente, as outras proteínas se encontrem em maior quantidade.

Segundo Kauffman e Keller (1979), a prolina representa cerca de 70% das proteínas produzidas nas parótidas e bloqueiam os taninos do alimento, dependendo a sua eficiência dos hábitos alimentares de cada animal em particular (Mehansho *et al*, 1987; Hagerman e Robbins, 1993). No entanto, outros estudos desenvolvidos por Juntheikki *et al* (1996) contrariam estes, já que a comparação entre as proteínas da saliva recolhida antes e após a exposição dos animais a alimentos ricos em taninos não apresentaram diferenças qualitativas. Quantitativamente falando, as diferenças foram pouco significativas e só em alguns animais.

Através de simulações *in vitro* chegou-se à conclusão que os complexos formados na boca permanecem insolubilizados quando se encontram em condições como as que podemos encontrar no estômago ou intestino (Cai *et al*, 2006). Outros autores indicam a actividade destas proteínas como bastante importantes na regulação do cálcio e de outros minerais (Hay *et al*, 1979 e Bennick *et al*, 1981).

- Formação dos iões complexos

Na formação deste complexos insolúveis tanino - proteína há 4 tipos de ligações: 1) de hidrogénio; 2) iónicas; 3) covalentes; 4) interacções hidrofóbicas. Em geral estas reacções de complexação são reversíveis, no entanto, se a reacção se der sob certas

condições (por ex. pH alcalino ou na presença de oxigénio), dá-se a oxidação dos taninos formando ligações covalentes com a proteína, tornando a reacção irreversível (Van Sumere *et al*, 1975; Haslam, 1980).

No entanto, segundo Price e Butler (1980), há formas de reduzir os efeitos negativos dos taninos, quer através da selecção genética, quer por processos de remoção ou inactivação, o problema é saber se essa selecção não conduz à perda de vantagens agronómicas que os taninos conferem às plantas. Assim, segundo Almeida (1986), tem-se investido na experimentação de vários métodos que, com este fim, não diminuem essas vantagens: 1) remoção física dos taninos; 2) adição, à dieta, de substâncias com capacidade complexante com os taninos; 3) tratamento químico *in situ* do produto alimentar para alterar o tanino; 4) adição à dieta de substâncias adjuvantes da destoxificação metabólica; 5) tratamento hormonal dos frutos; 6) selecção de variedades de plantas com baixo conteúdo em taninos. Todos estes processos parecem ser relativamente eficazes, o problema da sua aplicabilidade prática está relacionado com a sua viabilidade económica (Almeida, 1986).

As condições em que a reacção de complexação se dá têm demonstrado ser uma causa importante para a considerável variação da força de ligação entre a proteína e o tanino. Assim, uma das mais importantes é o grau de solubilidade do tanino e da proteína em água. A força da ligação será tanto maior quanto maior for este grau de solubilidade. São também importantes a proporção tanino/proteína, o pH (Luck *et al*, 1994) e a presença de sais biliares que, segundo Mole e Waterman (1985), contribuem para contrariar a acidez tão característica do ambiente gástrico, bastante desfavorável à formação de complexos, alterando a ligação em causa, favorecendo-a.

Os resultados do estudo desenvolvido por Martínez e Moyano (2003) demonstram que a pH 2-3 e 8-9 a proteína se encontra, maioritariamente, na sua forma solubilizada. Este estudo levou-os a propor que o facto de na parte proximal do intestino delgado, onde o pH é mais elevado, a maior parte da proteína se encontrar solubilizada, logo, livre para ser hidrolizada pelas enzimas, impedindo por isso a formação de complexos com os taninos na parte distal, onde o pH já é mais baixo. Como culminar deste processo verifica-se uma redução dos efeitos anti-nutricionais dos taninos no que se refere à imobilização da proteína. Comparativamente, parecem ser os taninos hidrolisáveis, aqueles que menos influenciam a digestão gástrica (já de si pouco significativa pois a maior parte dos complexos são dissociados a pH 1-2), principalmente quando a relação tanino/proteína é baixa (Almeida, 1986).

Como vimos, o pH é um factor essencial na estabilidade da ligação, no entanto as condições experimentais utilizadas na maior parte dos estudos *in vitro* são bastante

diferentes das que podemos encontrar no tracto gastrointestinal dos animais (Perez-Maldonado *et al.*, 1995) tornando difícil prever o comportamento *in vivo*.

Hay *et al*, em 1979, Schultz *et al*, 1981, e Bennick *et al*, no mesmo ano, verificaram, que a ligação tanino/proteína se dá em cadeia, isto é, que é necessária uma concentração mínima de tanino para desencadear uma série de reacções que levam à formação do complexo e à precipitação da proteína. Noutros estudos foi observado que esta ligação é bastante influenciada pelo tipo de tampão utilizado (Goldstein e Swain, 1965) e que a utilização de PEG desloca as proteínas dos complexos já formados, sem, no entanto, as deslocar a 100%. Eficiência essa em boa parte definida pela quantidade de tanino presente na ligação e pela “idade” desta, sendo que quanto mais baixa for a quantidade de tanino e mais recente for a ligação, mais fácil é a deslocação do tanino por parte do PEG (Jones e Mangan, 1977). No entanto, segundo vários estudos, por exemplo, os de Ben Salem *et al* (2000 e 2002) e Getachew *et al* (2001), foram identificadas francas melhorias no valor nutritivo de alimentos ricos em taninos, após a adição de PEG, devido à maior afinidade acima descritas.

- Inactivação de enzimas digestivas

Outra das problemáticas associadas aos taninos é a da inibição de enzimas digestivas, como a tripsina, α -amilase ou pepsina, tendo sido verificado por Tamir e Alumot (1969) que a tripsina o é em maior grau pelos taninos hidrolizáveis, ao contrário das outras em que não se notam diferenças significativas entre a inibição por parte deste tipo de taninos em relação aos condensados. No entanto, ao contrário do que se passa com outras proteínas, o efeito da estrutura dos taninos na formação e força de ligação destes complexos, carece de estudos (Hagerman, 1992).

4) O porco alentejano

Segundo Povoas Janeiro (1944), citado por Tirapicos Nunes (1993) a raça de porcos Alentejanos ou Ibéricos é caracterizada por possuir estatura meã, cerdas de comprimento médias e finas, pretas, castanhas ou ruivas, cabeça curta com tromba pontiaguda e ângulo fronto-nasal pouco pronunciado, orelhas finas, de tamanho médio e dirigidas quase horizontalmente para a frente, face curta e larga, pescoço de comprimento médio e musculado, costelas pouco compridas e arqueadas, o que leva o tronco a apresentar-se roliço mas pouco amplo, espádua de inclinação e desenvolvimento regulares, dorso curto com linha dorso-lombar rectilínea ou ligeiramente enclada, fraco desenvolvimento do rim, porém com boa direcção, cauda

fina e de média inserção, ossos delgados, aprumados e curtos, pés mediantemente desenvolvidos e de unha preta muito rija. Depois de gordos o ventre apresenta-se muito descaído, o flanco largo e pouco descaído, garupa pouco comprida e larga e com demasiada inclinação, coxas com espessura e comprimento deficientes e insuficientemente descidas. Assim o conjunto apresenta-se harmonioso embora parco em comprimento e altura.

Fisiologicamente possuem um temperamento vivo e pouco dócil, são muito rústicos e resistentes ao cansaço, ou seja, muitíssimo bem adaptados ao regime de exploração em que são usualmente inseridos. São muito pouco precoces, atingindo, no entanto, pesos consideráveis por volta dos 24 meses (até 250 Kg de peso vivo), com rendimento que pode chegar aos 85%. Possuem elevada tendência para engordar bastando 3 meses de acabamento numa boa montanha para obter os pesos pretendidos (Povoas-Janeiro, 1944, cit. por Tirapicos Nunes, 1993).

Em termos reprodutivos estes animais são pouco prolíficos com médias pouco superiores a 6 leitões por ninhada e com capacidade de aleitamento por parte das porcas muito fraca (Povoas-Janeiro, 1944, cit. por Tirapicos Nunes, 1993).

A produção de porcos Alentejanos ou Ibéricos no sistema de montanha consiste no acabamento de porcos entre os 14 e 18 meses de idade (Tirapicos-Nunes, 1993) e, ao contrário daquilo que normalmente se passa nos sistemas de produção intensiva de porcos onde o ambiente junto da exploração é muito afectado, é dos poucos casos onde a produção contribui decisivamente para preservar o ecossistema em que se insere (Lopez-Bote, 1998).

- Interacção animal/sistema

Um bom exemplo da boa interacção entre os porcos Alentejanos e o montado é a organização da produção de tal ordem que na altura de maior produção de bolota, entre Novembro e Fevereiro, os animais apresentam-se em fase de acabamento. A bolota confere características próprias e de altíssima qualidade aos produtos do porco através dos ácidos gordos insaturados, principalmente o ácido oleico, em que é rica (León Crespo, 1992). O reconhecimento recente, por um grande número de pessoas, da referida qualidade permitiu o desenvolvimento de indústrias especializadas, passando o seu consumo a estar relacionado com padrões de vida mais elevados. O valor acrescentado dos produtos possibilita a exploração destes animais, contribuindo decisivamente para a manutenção do montado e da raça em si (Daza, 1996), que, apesar de povoar a Península Ibérica desde à há muito tempo, viu diminuir drasticamente o tamanho e número de efectivos na segunda metade do séc. XX principalmente devido à peste suína africana e à menor procura de banha e de carnes

gordas. A partir da última década deste século observou-se um aumento espectacular no interesse deste tipo de exploração, com o correspondente aumento do número de porcos em linha pura ou cruzados.

No entanto, se o papel da bolota como fornecedora de grande quantidade de energia, pela riqueza de amido, é bem conhecido, já a função da fracção de erva da dieta, cuja disponibilidade se considera importante para uma boa montanha, está menos esclarecida.

5) Utilização de técnicas *in vitro* para determinação do efeito dos taninos do miolo da bolota sobre a digestibilidade das proteínas alimentares

Para efectuar esse estudo vamos utilizar a técnica de digestibilidade *in vitro* descrita por Boisen (2007) pois, segundo o próprio refere em 1998, a digestibilidade *in vitro* não é influenciada pelas perdas endógenas nem pela técnica utilizada *in vivo*, daí que os resultados da digestibilidade da proteína que este método nos fornece correspondam à digestibilidade real e não à aparente. No entanto, como qualquer técnica, este método apresenta algumas lacunas, por exemplo, a digestibilidade apresenta-se como o resultado de dois processos que competem entre si, a digestão e a velocidade de passagem e, para que se possa desenvolver modelos de digestão fiáveis, estes dois processos têm de ser devidamente quantificados, o que, segundo vários autores (Usry *et al*, 1991, Bastianelle *et al*, 1996 e Rivest *et al*, 2000), que desenvolveram metodologias *in vitro*, não acontece no que à dinâmica e, mais especificamente, ao tempo do trânsito digestivo, diz respeito. Também Pujol e Torrallardona, no seu trabalho publicado em 2007, consideram que o método tem de ser aperfeiçoado pois a sua resposta varia consideravelmente consoante os alimentos utilizados. Contudo, segundo Pujol *et al* (2001), o método desenvolvido por Boisen e Fernandez (1995) aparenta ser um método eficiente para predizer a digestibilidade nos porcos. Também Pujol e Torrallardona (2007) comparam a digestibilidade ileal aparente da proteína e aminoácidos *in vivo* com os resultados obtidos através desta técnica *in vitro*, concluindo que os resultados são significativamente diferentes no que respeita à Metionina e Treonina mas não para a proteína bruta e os outros aminoácidos.

Para que se possa comparar os registos *in vivo* com os resultados da técnica *in vitro* de uma dieta parte-se do princípio que os primeiros correspondem à soma dos resultados *in vitro* de cada um dos seus componente (Weurding *et al*, 2001 e Van Milgen *et al*, 2005).

6) Estimativa de ingestão e digestibilidade

A fim de ter uma noção mais exacta do equilíbrio dietético do animal deve-se estabelecer uma relação entre as necessidades nutricionais do animal e aquilo que o alimento consumido lhe proporciona (Dove e Mayes, 1991). No entanto isso só é possível se forem conhecidas a ingestão e a digestibilidade dos alimentos que, neste caso, o sistema de montanha oferece aos porcos. Estes parâmetros permitem, entre outras coisas, compreender o desempenho dos animais (Oliván e Osoro, 1997).

Nas últimas décadas foram desenvolvidas diversas técnicas para estimar a ingestão de alimentos em pastoreio, apresentando, todas elas, algumas limitações, tanto na precisão como na dificuldade de aplicação (Dove e Mayes, 1991).

Segundo Dove e Mayes (1991) para que a estimativa da ingestão e digestibilidade da dieta sejam possíveis deve-se aprofundar o conhecimento no que diz respeito à quantidade de erva ingerida, identificação das espécies seleccionadas pelos animais, especialmente no que diz respeito à diferença entre gramíneas e leguminosas, e quantificar os nutrientes que se encontram realmente disponíveis para o animal.

De todas as técnicas utilizadas para estimar a ingestão individual de animais em pastoreio aquelas que apresentam melhores resultados são as que se baseiam na estimativa da digestibilidade do alimento e determinação da produção fecal (Oliván e Osoro, 1997).

Utilizando a equação 1 descrita de seguida depreende-se que a estimativa da ingestão se encontra directamente dependente duma correcta avaliação da digestibilidade e da produção fecal (Cancela d'Abreu, 1992).

Equação 1

$$I = \frac{PF}{(1 - Dig)}$$

I – Ingestão
PF – Produção Fecal
Dig – Digestibilidade

- Estimativa da produção fecal

A produção fecal pode ser estimada a partir da recolha total das fezes, método bastante dispendioso, exigente em mão-de-obra e de difícil aplicação em animais explorados sob condições extensivas. Assim a estimativa de produção fecal utilizando marcadores externos tem-se revelado bastante favorável no que diz respeito à

facilidade de aplicação e à baixíssima interferência no comportamento do animal (Dove e Mayes, 1996).

Para uma substância ser considerada marcador fecal ideal deve ser totalmente recuperável nas fezes, de fácil identificação e análise, não pode sofrer qualquer alteração ao longo do tracto gastrointestinal, não deve ter qualquer efeito tóxico/fisiológico e deve ter características semelhantes às da dieta do animal (Dove e Mayes, 2003).

Equação 2

$$PF = \frac{D}{C}$$

PF – Produção Fecal (KgMS/dia)

D – Dose Fornecida do Marcador (mg/dia)

C – Concentração do Marcador nas Fezes (mg/KgMS)

Existem variadíssimos marcadores fecais, como o Óxido de Crómio (Cr_2O_3), que durante muito tempo foi o marcador fecal mais utilizado, mas que tinha como desvantagem a, por vezes, difícil homogeneização nos conteúdos digestivos implicando variações na concentração fecal. Além do Cr_2O_3 muitos outros marcadores podem ser utilizados, como o Óxido de Titânio (TiO_2), o Sulfato de Bário (BaSO_4), alguns elementos raros presentes no solo e com elevadas recuperações fecais como Itérbio (Yb) ou mesmo substâncias indigestíveis presentes na própria dieta como a lenhina ou a fracção ADF (Fibra Solúvel em Detergente Ácido), no entanto todos eles apresentam desvantagens que dificultam a sua utilização (Dove e Mayes, 1991, 2000, 2003).

- Estimativa da digestibilidade

Esta é uma estimativa ainda mais complicada e sujeita a maiores erros do que a fecal, já que, em pastoreio, os animais são bastante selectivos naquilo que comem, assim, as espécies vegetais consumidas podem não coincidir com as espécies vegetais existentes na pastagem (Mayes *et al*, 1995).

A digestibilidade pode ser calculada directamente a partir do conhecimento da ingestão e da produção fecal, na equação 3.

Equação 3

$$Dig = \frac{I - PF}{I} \times 100$$

Dig – Digestibilidade (%)

I – Ingestão (gMS)

PF – Produção Fecal (gMS)

Deve-se ainda chamar a atenção que a estimativa da digestibilidade *in vivo* representa uma digestibilidade aparente, isto é, subvalorizada devido a excreção de substâncias endógenas como o azoto metabólico (Mosenthin *et al.*, 1994; Van Barneveld, 1999), que pode aumentar na presença de alimentos ricos em taninos já que, como foi acima referido, estes podem aumentar a descamação interna do tracto digestivo.

- N – alcanos como marcador fecal

A utilização de componentes estruturais das plantas como marcadores internos apresenta várias vantagens nos estudos realizados em pastoreio pois permitem estimativas individuais sem ser necessário alterar minimamente a rotina dos animais (Mayes *et al.*, 1986). Nesta perspectiva Mayes *et al.*, (1995), propuseram como marcadores fecais um grupo de compostos bem definidos quimicamente, de fácil análise e aparentemente pouco absorvidos pelos animais, os n – alcanos. A partir desta altura vários autores utilizaram a técnica de estimativa de ingestão e digestibilidade com base nestes compostos em estudos que envolviam, na sua maioria, ruminantes (Dove e Mayes, 1991). Há também descrições de estudos de digestibilidade pela técnica dos n-alcanos, realizados entre outras espécies, com equídeos e com suínos mas em muito menor número (Sehested *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 1999; Ferraz de Oliveira *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007).

Os n – alcanos são compostos presentes nas ceras cuticulares das plantas, na sua maioria de cadeia impar, sendo os mais comuns aqueles que se encontram entre o C₂₅ e C₃₅, mais concretamente o C₂₉, C₃₁ e C₃₃ (Mayes, *et al.*, 1986).

Embora as recuperações fecais destes marcadores sejam, geralmente, inferiores a 100%, são elevadas o suficiente para se obterem resultados fiáveis (Bovolenta *et al.*, 1994). A recuperação fecal dos alcanos sintéticos é, geralmente, mais elevada, muito devido ao facto de, ao contrario dos naturais, se associarem à componente líquida da dieta, o que permite uma passagem mais rápida pelo tubo digestivo e, por isso, uma menor absorção (Dove e Mayes, 1991).

Para a estimativa de ingestão é doseado um alcano sintético de cadeia par, normalmente o C₃₂, por apresentar recuperações fecais elevadas e por existir em muito baixa concentração nas plantas. O n-alcano externo deve ser doseado de forma que a sua concentração nas fezes não seja significativamente diferente da dos alcanos naturais a fim de minimizar os erros que eventualmente possam surgir na análise cromatográfica (Oliván e Osoro, 1997).

É ainda importante referir que o alcano sintético administrado (cadeia par) deve ser adjacente ao natural (cadeia impar) para que a recuperação fecal dos dois seja semelhante, anulando, assim, o erro inerente ao facto da recuperação fecal não ser de 100% (Mayes *et al*, 1986).

De seguida apresenta-se a equação proposta por Dove e Mayes (1991) (Equação 4) através da qual estes autores estimaram a ingestão de erva com recurso a um par de alcanos:

Equação 4 – estimativa da ingestão com recurso a um par de alcanos

$$Ingestão \text{ (kgMS / dia)} = \frac{Dose_j \text{ (mg/dia)}}{\frac{Conc. \text{ fezes}_j \text{ (mg/kgMS)}}{Conc. \text{ fezes}_i \text{ (mg/kgMS)}} \times Conc. \text{ alimento}_i \text{ (mg/kgMS)} - Conc. \text{ alimento}_j \text{ (mg/kgMS)}}$$

i = n-alcano de cadeia ímpar

j = n-alcano de cadeia par

- Estimativa da composição da dieta

Os diferentes perfis de n-alcanos nas plantas, e até nas diferentes partes da mesma planta, podem ser utilizados para estimar a composição da dieta consumida pelo animal (Dove e Mayes, 1991). A proporção dos componentes da pastagem que apresentem um padrão de n-alcanos diferente, como é o caso, por exemplo, das gramíneas e das leguminosas, pode ser estimada através da técnica dos n-alcanos (Oliván e Osoro, 1997).

Segundo Dove e Mayes em 1996 os estudos de estimativa da composição da dieta realizados em equinos e suínos utilizando a técnica dos n-alcanos apresentam resultados favoráveis, com recuperações fecais elevadas.

A concentração de n-alcanos na dieta tradicional de porcos Alentejanos é relativamente baixa, devido à baixa concentração destes compostos na bolota, quando comparadas com as concentrações existentes nos componentes da pastagem (Ferraz de Oliveira *et al*, 2006), no entanto a qualidade dos produtos retirados destes animais quando explorados no sistema de montanha é de tal maneira importante que justifica um aperfeiçoamento da utilização desta técnica para estimar a dieta destes

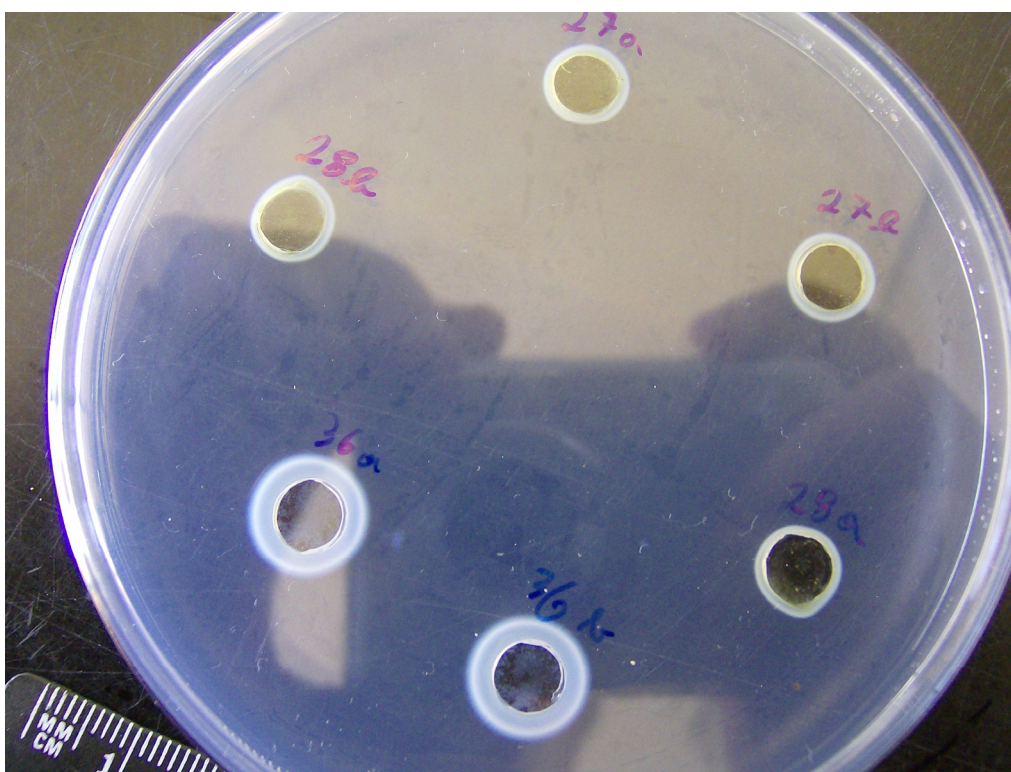
animais (Tejeda *et al*, 2000), já que esta tem grande influencia na superior qualidade dos produtos provenientes destes animais (De Pedro Sanz, 2000).

III. Materiais e métodos

1) Método da difusão radial

Foi utilizado o método descrito por Hagerman (1986), para determinar a actividade biológica dos taninos do miolo da bolota. É um método bastante simples, sensível e específico para taninos, que permite avaliar a actividade biológica destes compostos fenólicos que se difundem por um gel de agarose, que contém uma proteína específica, a BSA. Forma-se um halo bastante visível à medida que os taninos vão precipitando esta proteína que pode, facilmente, ser medido.

Figura 1 – Aspecto de uma placa após a realização do Método da Difusão Radial



Para a preparação das placas são pesados 2,5g de agarose em 250ml de uma solução tampão de acetato 0,05M a pH 5,0 e, com o auxílio duma barra de agitação, numa placa de aquecimento com agitação magnética deixa-se entrar em ebulição, com cuidado para não deixar ferver intensamente. Considerou-se que este processo estava terminado quando a solução se apresentava completamente translúcida e com uma coloração ligeiramente amarelada. Deixou-se arrefecer a solução em banho-maria até aproximadamente 45°C.

Quando a temperatura foi atingida juntaram-se 250mg de BSA e agitou-se com uma vareta até esta se encontrar totalmente dissolvida, sem deixar a temperatura baixar para facilitar o passo seguinte e, principalmente não deixar a temperatura subir, para não correr o risco de desnaturar a proteína.

De seguida verteram-se 10ml de solução de agarose em cada placa de petri (com 8,5cm de diâmetro) . É aconselhável que, tanto as pipetas como as placas, estejam aquecidas previamente para facilitar a dispersão da solução de agarose.

Imediatamente após este passo colocaram-se as placas a arrefecer sob uma superfície plana e, quando a solução já se encontrava perfeitamente solidificada, foram envolvidas numa película aderente para evitar contaminações do meio e colocadas no frigorífico.

No dia da realização do ensaio retiraram-se as placas do frigorífico e com o auxílio de uma sonda de 4mm de diâmetro fizeram-se 6 poços em cada placa com uma ligeira sucção através da sonda. Este procedimento é bastante delicado pois é nestes poços que vão ser colocadas os extractos de taninos das amostras, assim, devem ficar equidistantes e certos, isto é, as paredes dos poços devem ficar verticais e sem falhas.

Para efectuar a extracção dos taninos pesaram-se aproximadamente 200mg de amostra em duplicado para tubos de centrifuga e adicionou-se 1ml de solução de acetona/água (70:30). Colocaram-se os tubos em banho de ultra sons durante 20min e centrifugaram-se a 2500rpm durante 10min.

De seguida, de cada tubo, retiraram-se 30µl de extracto (sobrenadante) em 3 tomas de 10 µl de que se introduziram num poço previamente identificado. De cada tubo foram incubadas nos poços duas replicas de extracto de taninos.. Tivemos especial atenção para o poço não transbordar, o que o inviabilizaria.

Incubaram-se as placas numa estufa a 36°C durante 96h, período ao fim do qual foram retiradas, e se mediu o diâmetro do halo formado em cada poço, sendo que a quantidade de taninos é proporcional ao quadrado do diâmetro (d^2).

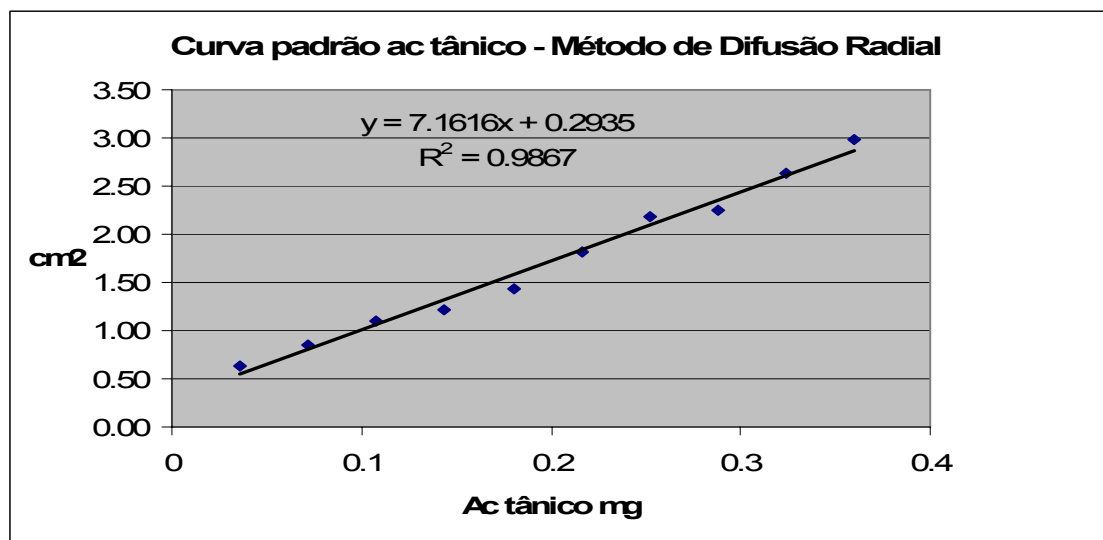
Foi feita uma curva padrão utilizando várias concentrações de uma solução de ácido tânico, cuja concentração inicial era de 4g por 100ml de solução de acetona/água (70:30), conforme a tabela 2, e onde se colocou em cada poço um volume igual ao colocado por cada amostra, também em duplicado. Assim, a quantificação dos taninos nas amostras de bolota é feita em equivalentes de ácido tânico (padrão).

Tabela 2 – Volumes de ácido tânico e solução de acetona/água (70:30) utilizados para preparar os padrões de ácido tânico

I. D.	Ácido tânico (4 g/100ml)	Solução acetona/água (70/30)	Ác. Tânico no padrão dispensado (mg)
Padrão 1	0,75	24,25	0,036
Padrão 2	1,50	23,50	0,072
Padrão 3	2,25	22,75	0,108
Padrão 4	3,00	22,00	0,144
Padrão 5	3,75	21,25	0,180
Padrão 6	4,50	20,50	0,216
Padrão 7	5,25	19,75	0,252
Padrão 8	6,00	19,00	0,288
Padrão 9	6,75	18,25	0,324
Padrão 10	7,25	17,75	0,360

Na figura 2 podemos observar a curva padrão determinada pelo método da difusão radial para determinar a quantidade de taninos da casca e miolo da bolota expressa em equivalentes de ácido tânico.

Figura 2 – Curva padrão do ácido tânico – Método da Difusão Radial



2) Efeito do PEG e da proteína do azevém ou do trevo encarnado na digestibilidade *in vitro* de misturas de bolota e erva

• Alimentos utilizados e sua análise

Neste trabalho utilizou-se bolota proveniente de *Quercus rotundifolia*, recolhida do chão entre Dezembro e Janeiro, foram também utilizados azevém anual (*Lolium westerwoldicum*) e trevo encarnado (*Trifolium incarnatum*) colhidos em Fevereiro de pastagens semeadas com as mesmas espécies em Outubro do ano anterior. Nas colheitas de pastagens houve o cuidado de separar as duas espécies em estudo.

A colheita de pastagens foi feita através do corte da vegetação junto ao solo utilizando um quadrado de 25x50cm. Foram realizados transectos lineares ao longo da pastagem tendo-se lançado o quadrado em pontos de paragem regulares.

Do material colhido foram separadas as duas espécies em estudo de forma a que o material utilizado no ensaio *in vitro* fosse homogêneo

Os alimentos foram armazenados a -20°C até serem descongelados e processados.

As amostras dos alimentos foram desidratados por liofilização e após se deixarem equilibrar com a humidade do ar, as amostras de bolota foram separadas em miolo e casca.

Todas as amostras foram moídas num moinho de ciclone com um crivo de 1mm e armazenados em separado.

Todas as amostras de alimento, quer as utilizadas no ensaio *in vitro*, quer as que foram recolhidas nas parcelas onde se realizou o ensaio *in vivo*, foram sujeitas à determinação de matéria seca (MS) (amostras de 3g e foram secas em estufa a 103°C durante cerca de 24h). A determinação de cinzas foi feita em sequência da MS, sendo as amostras incineradas numa mufla a 550°C durante 3h. A matéria orgânica foi calculada através da diferença entre matéria seca e cinzas.

O azoto total foi determinado pelo método de combustão (990.03 – AOAC, 1990) num sistema da LECO (FP528), sendo o teor em proteína bruta o resultado do azoto multiplicado pelo factor de conversão 6,25. Por fim a fibra insolúvel em detergente neutro (NDF) ou em detergente ácido (ADF) foram determinadas segundo Goering e Van Soest (1970) modificado por Van Soest e Robertson (1980).

É de referir que todas as amostras foram analisadas em duplicado e os resultados expressos na matéria seca ou matéria orgânica.

- **Determinação da digestibilidade *in vitro***

A digestibilidade da proteína de amostras de miolo de bolota, azevém e trevo encarnado foi determinada pela técnica *in vitro* proposta por Boisen e Fernandez, (1995)

Foram incubadas amostras de miolo de bolota e misturas deste com azevém, trevo encarnado ou PEG segundo o esquema da tabela 3. O nível de miolo de bolota foi mantido constante para manter constante o nível de taninos da mistura.

Aumentou-se progressivamente a quantidade de azevém e trevo para se obterem níveis crescentes de proteína bruta, tendo em atenção a natureza da proteína consoante a espécie vegetal. As amostras (cerca de 0,5g) para determinação de digestibilidade *in vitro* foram colocadas em matrizes de 100 ml, incluindo 3 a 4 brancos em cada série. De seguida adicionou-se 25 ml de tampão fosfato (0,1 M pH6,0) tendo sempre o cuidado de agitar suavemente a fim de promover uma boa mistura da amostra com o tampão. Adicionou-se 10 ml de HCl (0,2M) e ajustou-se o pH para pH2 (com HCl 1M e NaOH 1M). Adicionou-se 0,5 ml de cloranfenicol e 1 ml de solução de pepsina (25mg/ml) preparada de fresco, fecharam-se os matrizes com tampas de borracha e incubou-se durante 2h a 39 °C com agitação suave e constante.

Passadas as 2h de incubação retiraram-se os matrizes da estufa e adicionaram-se 10 ml de tampão fosfato (0,2M pH6,8) e 5 ml de NaOH (0,6M) para, de seguida, ajustar o pH a pH 6,8 (novamente com HCl 1M e NaOH 1M). Adicionou-se 1 ml de uma solução de pancreatina em tampão fosfato (0,2M pH6,8) (100mg/ml) preparada na altura com o solvente ligeiramente aquecido, mantida em agitação durante 15min e, posteriormente centrifugada durante 10min a 3000rpm. Esta alteração à técnica inicial foi sugerida por Boisen em 2008 (comunicação pessoal). Taparam-se os matrizes e colocaram-se na estufa a 39°C com agitação suave durante 18h.

Terminada a segunda incubação adicionou-se 5ml de uma solução de ácido sulfosalicílico a 20% a cada matriz e deixou-se repousar à temperatura ambiente durante 30min, findos os quais se filtrou o conteúdo dos matrizes em cadinhos filtrantes com celite previamente tratados. O tratamento dos cadinhos foi feito da seguinte forma: os cadinhos filtrantes (G2) foram incinerados na mufla a 550°C durante 3 horas. Colocou-se cerca de 0,4g de Celite tratada (lavada e muflada) por forma a cobrir toda a placa filtrante a fim de ajudar na filtração. De seguida lavaram-se bem os cadinhos contendo celite com água bem quente (3 lavagens) e deixou-se uma noite na estufa a 100°C para posteriormente serem pesados.

Aquando da filtração os matrizes são lavados com uma solução de ácido sulfosalicílico a 1% até não restar amostra dentro deles. De seguida lavaram-se os

cadinhos com acetona, secou-se o resíduo não digerido dentro destes numa estufa a 80°C durante uma noite e pesaram-se os cadinhos secos.

Após a pesagem homogeneizou-se o resíduo presente no cadinho (resíduo não digerido e celite) que foi colocado, na sua totalidade, dentro de cápsulas de estanho para determinar o azoto total através do método de combustão. A digestibilidade da proteína foi calculada através da diferença entre a quantidade total de proteína na amostra incubada e a quantidade de proteína no resíduo não digerido.

Tabela 3 – Misturas de miolo de bolota e azevém ou trevo para ensaio de digestibilidade *in vitro*

Peso de Bolota (g)	Peso de Azevém (g)	Peso de Trevo (g)	Quantidade de PEG (ml)
0,5	-	-	-
0,3	0,02	-	-
0,3	0,05	-	-
0,3	0,1	-	-
0,3	0,2	-	-
0,3	0,3	-	-
0,3	0,4	-	-
0,3	0,5	-	-
-	0,5	-	-
0,3	-	0,1	-
0,3	-	0,2	-
0,3	-	0,3	-
0,3	-	0,4	-
-	-	0,5	-
0,5	-	-	0,15
0,5	-	-	0,30
0,5	-	-	0,45

3) Efeito da composição da pastagem e da bolota tratada com PEG na digestibilidade da proteína da dieta de porcos Alentejanos

O ensaio *in vivo* aqui descrito insere-se num projecto de investigação financiado pela FCT (POCI/CVT/60411/2004) a decorrer na Universidade de Évora, tendo sido realizado pela equipa do projecto. O autor não tendo participado na fase de execução do ensaio *in vivo*, apenas utilizou os dados que lhe foram disponibilizados.

Para estudar o efeito da composição da pastagem e da bolota tratada com PEG na digestibilidade da proteína realizou-se um ensaio com porcos Alentejanos.

Em Outubro de 2005, na Herdade da Mitra, foram semeadas duas pastagens com cerca de 1ha cada, uma de *Lolium westerwoldicum* e outra de *Trifolium incarnatum*. Foram também instaladas cercas e infra-estruturas para fornecimento individual de bolota aos porcos. Entre os meses de Outubro e Dezembro procedeu-se à apanha de bolota de azinheira para realização do ensaio.

No início de Janeiro, vinte porcos Alentejanos, com cerca de 90kg de peso vivo foram distribuídos em classes de pesos e aleatoriamente afectados a quatro grupos correspondentes aos quatro tratamentos em teste. Os animais foram todos sujeitos a um regime alimentar constituído por pastagem (pastoreio directo) e bolota *ad libitum* distribuída individualmente, duas vezes por dia, correspondendo os quatro tratamentos a: T1 - pastagem semeada (*Trifolium incarnatum*) e bolota tratada com PEG; T2 - pastagem semeada (*Trifolium incarnatum*) e bolota sem PEG; T3 - pastagem semeada (*Lolium westerwoldicum*) e bolota tratada com PEG; T4 - pastagem semeada (*Lolium westerwoldicum*) e bolota sem PEG. O PEG 6000, na quantidade de 12,5g/kg de bolota, era adicionado em pó à bolota inteira, na altura do seu fornecimento aos porcos, e cada grupo dispunha de uma pastagem com cerca de 0,5ha.

Os animais permaneceram no campo com os regimes alimentares acima descritos durante 1 mês. Durante todo este tempo os porcos eram recolhidos 2 vezes por dia, ao amanhecer e às 15h, confinados em baias individuais com comedouros onde era fornecida a bolota tratada, ou não, com PEG. Realizaram-se dois períodos de colheita de amostras que consistiram em fase de adaptação (5 dias) aos marcadores (n-alcanos) C32 e C36, veiculados em bolota moída distribuída imediatamente antes das duas refeições diárias de bolota, e fase de colheita de fezes (5 dias), com continuação de fornecimento dos marcadores. As amostras de fezes foram colhidas duas vezes por dia *per rectum*, após o fornecimento de bolota e antes da libertação dos porcos para as pastagens. As amostras de fezes foram pesadas, congeladas, liofilizadas e moídas para preparação de amostra compósita por porco.

A preparação das doses de n-alcanos externos foi feita usando uma solução de C32 e C36 em heptano de forma a veicular 50mg e 46mg respectivamente por dose de 60g de bolota moída. A solução de n-alcanos foi preparada a quente a fim de obter uma total dissolução destes e aspergida sobre a quantidade total de bolota moída. Para obter a concentração final de n-alcanos doseados aos animais foi feita a extracção e determinação dos mesmos nas doses.

Durante os dois períodos de colheitas os refugos de bolota, por refeição e por animal, foram recolhidos, pesados, desidratados em estufa a 65 °C e moídos para preparação de amostra compósita.

A avaliação da composição florística das pastagens foi feita através da realização de transectos lineares ao longo das pastagens tendo-se registado, em pontos de paragem regulares, a identidade das espécies. A colheita de amostras de pastagem para a caracterização química e perfil de n-alcanos foi feita através da realização de 8 cortes efectuados em cada parcela a meio do período de permanência dos animais na pastagem, a meio de Janeiro de 2006 (com sensivelmente 3,5 meses). As amostras colhidas em cada folha de ensaio foram posteriormente separadas nos seguintes grupos: família das leguminosas, família das gramíneas e outras famílias. As amostras de erva foram congeladas, liofilizadas e moídas para posterior análise. Durante o ensaio foi também colhida uma amostra representativa de bolota, que após separada em casca e miolo foi congelada, liofilizada e moída.

A avaliação da composição florística foi feita através da realização de transectos lineares ao longo da pastagem tendo-se registado, em pontos de paragem regulares, a identidade das espécies.

As amostras de alimentos, refugos e fezes foram sujeitas a análise de n-alcanos de acordo com o método proposto por Mayes *et al.*, (1986) e modificado por Dove e Mayes (2006) utilizando GC-FID, para estimativa da composição da dieta, ingestão e digestibilidade. As concentrações de n-alcanos utilizadas para a estimativa dos diferentes parâmetros foram determinadas no âmbito do projecto POCI/CVT/60411/2004 no qual se inseriu este trabalho. As amostras de alimento refugo e fezes foram ainda sujeitas a determinação de matéria seca, cinzas, proteína bruta NDF e ADF utilizando os métodos já referidos em 2). As amostras de bolota, fezes e refugos foram ainda sujeitas à determinação de amido total por um método enzimático (método AOAC 996.11).

A composição da dieta foi avaliada através da comparação do perfil de n-alcanos excretados com o dos componentes da dieta através de programação linear, utilizando o programa informático “Eatwhat” (Diet selection calculator, version 1.2, Dove and Moore, 1996).

A ingestão da bolota foi calculada a partir da quantidade distribuída menos os refugos.

A estimativa da ingestão de erva foi feita através da utilização da técnica dos n-alcanos, adaptando a equação proposta por Mayes *et al.* (1986) e alterada por Rivera Ferre *et al.* (2001), considerando a bolota fornecida em quantidade conhecida e a bolota marcada com n-alcanos externos como suplementos alimentares:

Equação 5

$$MO_{ia} = \frac{\left[\left(\frac{C_{29e}}{RF_{29}} \right) / \left(\frac{C_{32e}}{RF_{32}} \right) \right] \times (D_{32ix} + D_{32is} - D_{32ir}) - (D_{29ix} + D_{29is} - D_{29ir})}{C_{29ia} - \left[\left(\frac{C_{29e}}{RF_{29}} \right) / \left(\frac{C_{32e}}{RF_{32}} \right) \right] \times C_{32ia}}$$

MO – Matéria orgânica (kg)
i – ingerido
e – excretado
a – alimento (erva)
x – alimento marcado (bolota marcada com n-alcanos)
s – suplemento (bolota fornecida)
r – refugo (recolhido de bolota)
C – concentração (mg/kgMO)
D – dose (mg)
RF – recuperação fecal
29 – alcano ímpar considerado
32 – alcano par considerado

A estimativa da ingestão foi feita com base na matéria orgânica por se ter observado haver ingestão de terra por diversos animais e porque as amostras de erva se mostraram por vezes contaminadas com terra. A partir da ingestão de bolota e da erva, calculou-se a ingestão de proteína bruta.

A digestibilidade da matéria orgânica e proteína bruta foi calculada a partir da estimativa da ingestão e da produção fecal, aplicando a fórmula geral de digestibilidade (Equação 3).

4) Análise estatística

- **Ensaio *in vitro***

Foi determinada a correlação entre os valores de proteína bruta nas misturas e a digestibilidade *in vitro* para cada tratamento e calculadas equações de regressão que melhor explicassem a variação da digestibilidade da proteína bruta.

- **Ensaio *in vivo***

O delineamento experimental do ensaio *in vivo* consistiu no estabelecimento de 2 pastagens semeadas com *Lolium westerwoldicum* e *Trifolium incarnatum* onde foi distribuída bolota tratada ou não com PEG aos animais, resultando num delineamento factorial de 2x2. Em cada tratamento existiam 5 replicas sendo considerados os animais como unidades experimentais. Os parâmetros medidos/estimados neste ensaio foram submetidos a uma análise de variância factorial. A significância dos valores foi estabelecida para probabilidades inferiores a 5%.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS, versão 16.

IV. Resultados e Discussão

1) Teor em taninos da bolota

O teor em taninos da bolota é difícil de quantificar, já que se trata de um grupo de compostos muito complexo. No contexto deste trabalho, interessa particularmente avaliar actividade biológica dos taninos da bolota que se traduz na sua capacidade de precipitar proteína. Para isso foi escolhido o método da difusão radial, que equipara este efeito biológico ao do ácido tânico.

Na tabela 4 apresentamos o teor de taninos da bolota utilizada neste trabalho, em equivalentes de ácido tânico.

Tabela 4 – Teor de taninos da bolota utilizada no ensaio *in vitro* medidos como equivalentes de ácido tânico

Amostra	Equivalente de Ácido tânico (g/KgMO)
Bolota inteira	40,13
Miolo de Bolota	45,71
Casca de Bolota	25,93

Os valores apresentados na tabela 4 foram obtidos utilizando a recta padrão apresentada na figura 2. O teor de taninos no miolo da bolota, medido pelo método da difusão radial é bastante mais elevado do que aquele medido na casca. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Cantos *et al* (2003), que quantificou estes compostos por HPLC-DAD e HPLC-MS/MS e conclui que o miolo tem uma maior quantidade de taninos que a casca da bolota.

2) Efeito do PEG e da proteína do azevém ou do trevo encarnado na digestibilidade *in vitro* de misturas de bolota e erva

- **Composição química dos alimentos utilizados**

Tal como foi referido nos materiais e métodos os alimentos utilizados no ensaio *in vitro* foram analisados para a matéria seca, matéria orgânica, e teores de proteína bruta, NDF e ADF. Os resultados da composição química dos alimentos apresentam-se na Tabela 5.

Tabela 5 – Composição química dos alimentos utilizados no ensaio *in vitro*

Alimentos	MS i (g/kg)	MS r (g/kg)	MO (g/kgMS)	PB (g/kgMS)	NDF (g/kgMS)	ADF (g/kgMS)
Miolo de bolota	616,9	952,2	978,1	61,9	27,4	5,8
Trevo	151,6	909,0	927,1	282,6	245,5	137,7
Azevém	227,2	935,4	925,6	132,3	345,3	169,7

MS i – Teor em Matéria Seca determinada após liofilização

MS r – Teor em Matéria Seca residual

MO – Teor em Matéria Orgânica

PB – Teor em Proteína Bruta

NDF – Fibra Solúvel em Detergente Neutro

ADF – Fibra Solúvel em Detergente Ácido

No que diz respeito à bolota, tanto o teor de matéria seca como o teor de proteína bruta do miolo de bolota utilizado neste ensaio encontram-se em consonância com os valores apresentados por Almeida (1986) e Tirapicos-Nunes (2007) entre outros, sendo importante salientar que, no caso da proteína bruta, estamos em presença de valores bastante baixos.

Já quanto ao trevo e ao azevém, podemos verificar que possuíam teores de matéria seca e orgânica dentro daquilo que seria espectável, já que eram plantas num estado vegetativo bastante jovem. O teor de proteína bruta do trevo é bastante elevado enquanto que o do azevém é bastante mais baixo mas razoável considerando que é uma gramínea.

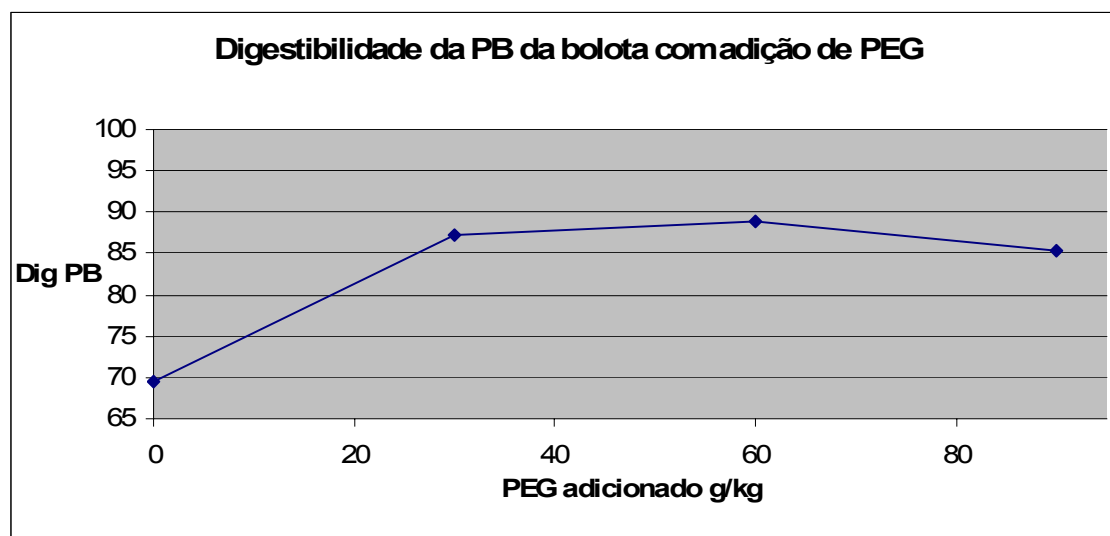
- **Estimativa de digestibilidade *in vitro* de bolota pura com adição de quantidades crescentes de PEG**

No ensaio de digestibilidade da proteína bruta (PB) da bolota com PEG podemos, tanto na tabela 6 como na figura 3, observar que a digestibilidade da PB do miolo de bolota é de cerca de 69%, aumentando para 87% logo no primeiro nível de adição de PEG, mantendo-se com valores semelhantes para níveis superiores deste composto. Estes resultados estão de acordo com aquilo que Palmer e Jones obtiveram em 2000, ou seja, que a resposta da digestibilidade da proteína bruta à adição de PEG é muito acentuada, atingindo, desde logo, o máximo de digestibilidade da proteína em questão.

Tabela 6 – Quantidades de bolota e PEG utilizados e respectiva digestibilidade *in vitro* de PB (média \pm desvio padrão)

Amostrade miolo de bolota (g)	PEG adicionado (gPEG/kg miolo bolota)	Dig PB (%) \pm dp
0,5	0	69,5 \pm 0,50
0,5	30	87,1 \pm 0,11
0,5	60	88,9 \pm 1,58
0,5	90	85,3 \pm 0,61

Figura 3 – Evolução da digestibilidade da PB da bolota com adição de solução de PEG



O efeito da adição de PEG na digestibilidade da proteína bruta do miolo mostra que os taninos têm um marcado efeito biológico sobre a digestibilidade da fracção azotada dos alimentos, tal como já foi referido por muitos autores (Reed, 1995). A relativamente baixa digestibilidade da proteína da bolota deve-se, em parte, à presença dos taninos que a bloqueiam através da formação de complexos insolúveis. Por outro lado, o facto da digestibilidade *in vitro* da PB do miolo de bolota se situar nos 69% sugere que, ou a quantidade de taninos presente no miolo da bolota é insuficiente para bloquear toda a sua proteína, ou que a afinidade destes taninos para esta proteína é baixa.

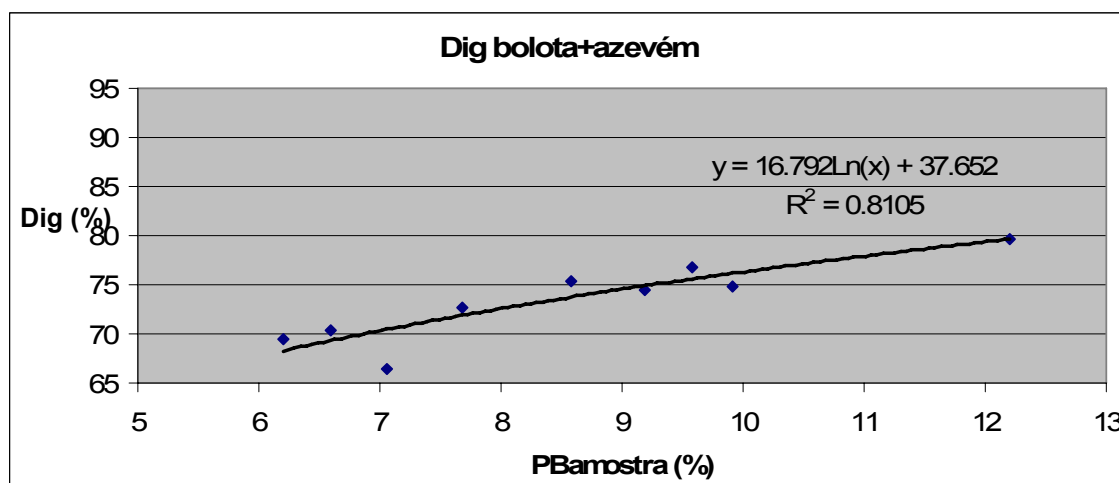
- **Estimativa de digestibilidade *in vitro* de misturas de bolota com azevém**

Para avaliar de que maneira a proteína do azevém influencia a digestibilidade *in vitro* da bolota foram realizadas incubações consoante a tabela 3 descreve. As digestibilidades *in vitro* da proteína bruta de misturas de miolo de bolota e azevém com quantidades crescentes de proteína bruta apresentam-se na tabela 7 e na figura 4.

Tabela 7 – Quantidades de bolota e de azevém utilizados para este ensaio e respectiva digestibilidade *in vitro* da PB (média \pm dp)

Amostra bolota/azevém (g)	Média PB amostra (%_{naMS})	Dig PB (%) \pm dp
0,5/0	6.2	69,5 \pm 0,50
0,3/0,02	6.59	70,3 \pm 0,13
0,3/0,05	7.06	66,4 \pm 3,14
0,3/0,1	7.67	72,6 \pm 1,02
0,3/0,2	8.57	75,3 \pm 0,12
0,3/0,3	9.18	74,5 \pm 0,35
0,3/0,4	9.58	76,8 \pm 1,25
0,3/0,5	9.91	74,9 \pm 0,15
0/0,5	12.21	79,7 \pm 1,66

Figura 4 – Evolução da digestibilidade da proteína bruta da bolota com adição de azevém



Após serem testados vários modelos para explicar a digestibilidade *in vitro* da proteína bruta, escolheu-se a equação logarítmica por ter o melhor coeficiente de determinação. Esta metodologia foi seguida para a obtenção de todas as equações de regressão apresentadas neste trabalho.

O coeficiente de determinação (R^2), desta equação, indicador da relação entre a variação digestibilidade explicada pela equação proposta e variação observada nos resultados, apresenta um valor de 0,8105 essencialmente devido ao valor da digestibilidade *in vitro* da proteína bruta da mistura de bolota e azevém de 0,3g/0,05g, que se desvia da linha definida pelas outras digestibilidades determinadas. Esta equação indica que à medida que vamos aumentando o nível de proteína bruta da mistura, os incrementos na digestibilidade da proteína bruta vão sendo menores o que se justifica pela diluição da fracção tornada indigestível pelos taninos que é aparentemente constante.

Equação 6

$$Y = 16,792Ln(X) + 37,652$$

Através da análise da tabela 7 e da figura 4, relativos às incubações de misturas de bolota com azevém foi possível constatar um aumento da digestibilidade da proteína bruta à medida que o teor desta última aumentava na amostra, até ao nível de 0,1g de azevém, a partir do qual se nota uma diminuição do efeito sobre o valor da digestibilidade, aumentando visivelmente outra vez com o último nível, onde o facto de ser retirada toda a bolota levou a um incremento proteico considerável, o que nos níveis anteriores não aconteceu, e pode explicar o aumento de digestibilidade observado.

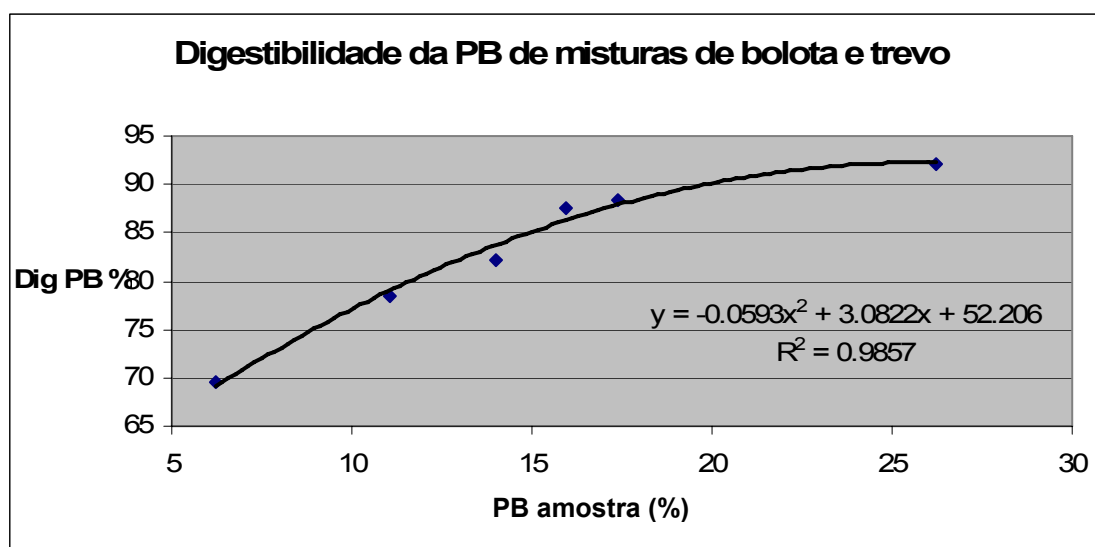
- **Estimativa de digestibilidade *in vitro* de misturas de bolota com trevo**

Para avaliar o efeito da proteína do trevo na digestibilidade *in vitro* de misturas de miolo de bolota com trevo fizemos incubações consoante a tabela 3 descreve. As digestibilidades *in vitro* da PB encontram-se discriminadas na tabela 8 e na figura 5.

Tabela 8 – Quantidades de bolota e de trevo utilizados para este ensaio e respectiva digestibilidade *in vitro* da PB (média \pm desvio padrão)

Amostra bolota/trevo (g)	Média PB amostra (% _{naMS})	Dig PB (%) \pm dp
0,5/0	6.2	69,5 $\pm 0,50$
0,3/0,1	11.03	78,4 $\pm 0,09$
0,3/0,2	13.98	82,2 $\pm 2,55$
0,3/0,3	15.97	87,6 $\pm 2,37$
0,3/0,4	17.39	88,4 $\pm 0,44$
0/0,5	26.19	92,1 $\pm 0,21$

Figura 5 – Evolução da digestibilidade da proteína bruta da bolota com adição de trevo



Desta feita, para a digestibilidade relativa às misturas de miolo de bolota com quantidades crescentes de trevo, a equação que mais se adequa é uma equação polinomial de segundo grau (Equação 7) também com um R^2 elevado ($R^2=0,9857$).

Equação 7

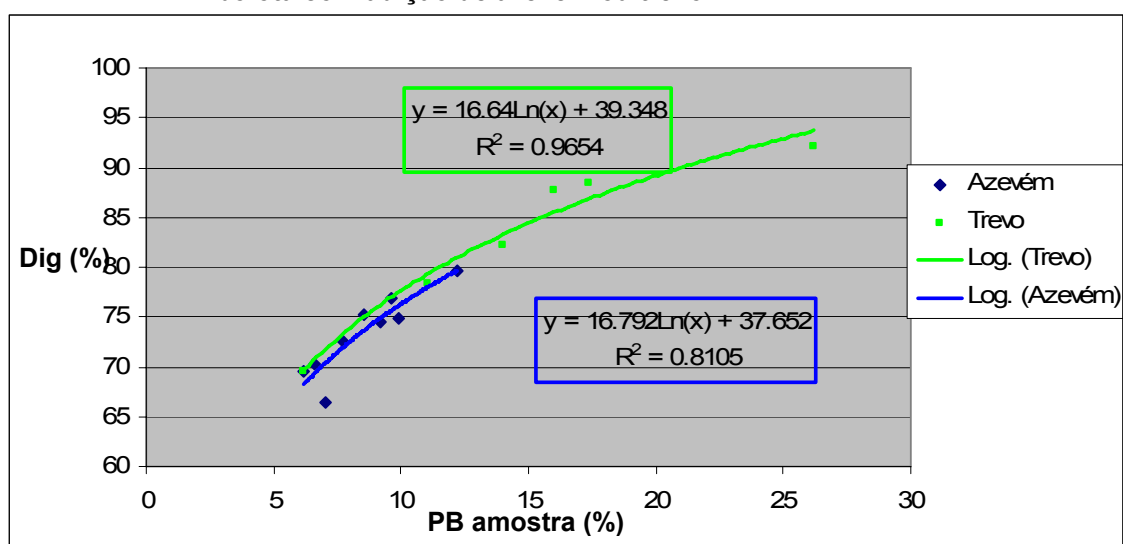
$$Y = -0,0593X^2 + 3,0822X + 52,206$$

É importante referir que as variações de digestibilidade de nível para nível de proteína bruta da amostra incubada parecem ser bem mais regulares, quando comparadas com as verificadas nas incubações com azevém. Isto deve-se, provavelmente, pelo facto dos intervalos entre os vários níveis de proteína bruta serem também eles, bem mais regulares, sendo que, no último nível voltou a acontecer um aumento da diferença de digestibilidade, provavelmente devido aos mesmos motivos que foram enunciados para justificar aumento semelhante nas incubações referentes à misturas bolota/azevém.

- **Comparação entre as estimativas de digestibilidade *in vitro* entre misturas de bolota com azevém ou com trevo**

Através da comparação entre os resultados das incubações *in vitro* utilizando misturas de azevém ou trevo pretendeu-se avaliar a possível alteração de comportamento por parte dos taninos do miolo de bolota consoante o tipo de proteína presente em cada uma das espécies. Comparação essa que se encontra ilustrada na figura 6.

Figura 6 – Comparação entre a evolução da digestibilidade da proteína bruta da bolota com adição de azevém ou trevo



Em primeiro lugar é essencial referir que tendo em atenção os resultados das incubações de misturas de bolota e azevém e, posteriormente, de bolota e trevo, foram calculadas equações de regressão que melhor descrevessem os dados observados que no caso do azevém era uma equação logarítmica (fig.4 do azevém) e

no trevo polinomial de 2º grau (fig.5 do trevo), ambas com R² elevados. Para comparar as duas forragens utilizámos as equações logarítmicas para ambas uma vez que mesmo no trevo o R² é elevado (fig.6).

A evolução das curvas de digestibilidade quando se junta azevém ou trevo à bolota apresentam-se praticamente paralelas. O que pode sugerir que a proteína da bolota é suficiente para anular os efeitos biológicos antinutricionais dos taninos, logo, que a digestibilidade da proteína bruta de 69% quando estamos na presença de bolota pura se deve à quantidade de taninos existentes e não à sua possível baixa afinidade para estas proteínas. O aumento da digestibilidade da proteína apresenta-se idêntico pois representa acréscimos proporcionais aos acréscimos de proteína bruta das misturas de bolota e azevém ou trevo, sendo a curva relativa ao ensaio com trevo sempre superior devido à mais elevada digestibilidade da proteína deste quando comparada com a do azevém, 92,1% e 79,7%, respectivamente.

O facto dos valores de digestibilidade da proteína bruta das misturas de miolo e erva serem muito inferiores às digestibilidades individuais do trevo e azevém (92,1% e 79,7%) deve-se à baixa digestibilidade da proteína da bolota devido aos taninos nela presentes. Efeito esse perfeitamente visível na fig.3 onde a adição de PEG bloqueia estes compostos libertando a proteína para ser digerida, verificando-se um consequente aumento da digestibilidade da proteína bruta.

O que pode ser verificado nos resultados obtidos é confirmado pela comparação entre eles e a aplicação dos valores da digestibilidade individual dos alimentos às quantidades de cada um nas misturas segundo a seguinte equação:

Equação 8

$$DIG_{PBDIETA} = (Q_{BOLOTA} \times PB_{BOLOTA} \times Dig_{PBBOLOTA}) + (Q_X \times PB_X \times Dig_{PBX})$$

Dig_{PBDIETA} – Digestibilidade da Proteína Bruta da Dieta

Q_{BOLOTA} – Quantidade de Bolota Consumida

PB_{BOLOTA} – Teor de Proteína Bruta da Bolota

Dig_{PBBOLOTA} – Digestibilidade da Proteína Bruta da Bolota

Q_X – Estimativa da Quantidade de Trevo ou Azevém Ingerida

PB_X – Teor de Proteína Bruta de Trevo ou Azevém

Dig_{PBX} – Digestibilidade da Proteína Bruta de Trevo ou Azevém

O que confirma que a quantidade de proteína existente na bolota é suficiente para bloquear os seus taninos, já que, caso assim não fosse, haveria influência destes na digestibilidade dos outros componentes da dieta, provocando a sua diminuição.

Conclusão semelhante foi a obtida por Weurding *et al* (2001) e Van Milgen *et al* (2005) que, para comparar esta estimativa *in vitro* com os resultados *in vivo* faz corresponder estes últimos à soma das digestibilidades individuais de cada um dos componentes da dieta obtidos *in vitro*.

A partir dos resultados obtidos podemos colocar a hipótese de que o papel da erva na alimentação de porcos em montanha não será o de bloquear os taninos existentes na bolota mas sim o de fornecedor de proteína, já que devido ao baixo teor de proteína bruta da bolota e a sua relativamente baixa digestibilidade, a quantidade de proteína disponível seria muito baixa (cerca de 4,3% de proteína bruta digestível na matéria seca).

3) Efeito da composição da pastagem e da bolota tratada com PEG na digestibilidade da proteína da dieta de porcos Alentejanos

- **Composição química dos alimentos utilizados**

Tal como foi referido nos materiais e métodos os alimentos utilizados no ensaio *in vivo* foram analisados para a matéria seca, matéria orgânica, e teores de proteína bruta, NDF, ADF e, no caso da bolota, de amido. Os resultados dessas análises são descritos na Tabela 9.

Tabela 9 – Composição química dos alimentos utilizados no ensaio *in vivo*

Alimentos	MS i (g/kg)	MS r (g/kg)	MO (g/kgMS)	PB (g/kgMO)	NDF (g/kgMO)	ADF (g/KgMO)	Amido (g/kgMS)
Bolota inteira	617.6	811.9	980.5	59.2	141.4	49.2	729.5
Miolo de bolota	616.1	908.9	982.8	51.7	161.5	46.5	688.1
Casca de bolota	663.8	908.2	974.2	42.7	752.8	648.6	-
Folha de leguminosas (tratamentos I,II)							
Leguminosas I, II	215.3	929.4	853.2	301.4	320.2	235.2	-
Gramíneas I, II	208.6	932.9	818.1	183.9	588.4	328.2	-
Amostra global I	315.0	946.1	595.5	201.9	898.9	734.0	-
Outras I	194.3	938.8	739.7	239.9	328.1	386.0	-
Amostra global II	182.6	942.5	761.1	269.3	516.9	367.6	-
Outras II	151.1	950.6	799.9	236.5	447.7	331.9	-
Folha de gramíneas (tratamentos III,IV)							
Leguminosas III,IV	242.5	940.1	853.2	297.2	374.8	343.2	-
Gramíneas III,IV	245.1	945.8	859.8	140.9	468.2	240.6	-
Amostra global III	231.7	946.2	743.7	191	599.8	413.6	-
Outras III	154.6	961.9	751.5	296.9	473.6	369.5	-
Amostra global IV	216.2	951.8	777.3	161.8	559.1	355.4	-
Outras IV	179.0	949.1	799.4	196.9	430.1	284	-

MS i – Teor em Matéria Seca determinada após liofilização

MS r – Teor em Matéria Seca residual

MO – Teor em Matéria Orgânica

PB – Teor em Proteína Bruta

NDF – Fibra Solúvel em Detergente Neutro

ADF – Fibra Solúvel em Detergente Ácido

No que diz respeito aos alimentos utilizados no ensaio *in vivo* verificamos que a bolota apresenta valores de matéria seca e de matéria orgânica muito superiores aos apresentados pela erva, ao contrário do que podemos verificar quando comparamos teores de proteína bruta, NDF ou ADF, todos eles bastante inferiores no caso da bolota. Ainda a respeito deste alimento verifica-se que apresentava uma composição química muito semelhante à bolota utilizada no ensaio *in vitro*.

Quanto à fracção de erva, apresentaram valores baixos de matéria seca e orgânica, perfeitamente admissível por estarmos a falar de alimentos colhidos no campo em Fevereiro, ou seja, num estado vegetativo extremamente jovem. Por outro lado, por este mesmo motivo seria de esperar teores de NDF e de ADF nesta ordem de grandeza, exceptuando os valores da amostra global I, que apresentam resultados demasiado elevados, talvez por incluírem espécies arbustivas.

Já no que à análise da proteína bruta diz respeito, é possível verificar que a família das leguminosas apresentam valores muito mais elevados que a das gramíneas, em todos os quatro tratamentos e com a fracção das “outras” com valores intermédios, sendo que no tratamento III o teor proteico desta fracção é muito semelhante ao apresentado pela família das leguminosas. É importante salientar que o teor de proteína bruta da amostra global é dependente da composição florística das pastagens, daí que, logicamente, seja superior quando esta apresenta mais leguminosas e inferior quando são as gramíneas que predominam.

- Composição dos alimentos em n-alcanos

A concentração de n-alcanos (C25 a C36) da bolota e da erva utilizadas no ensaio *in vivo* apresentam-se nas tabelas 10 e 11.

Todas as concentrações de n-alcanos aqui apresentadas foram obtidas a partir do relatório do projecto POCI/CVT/60411/2004 no qual se inseriu este trabalho.

Tabela 10 – Composição em n-alcanos da bolota (mg/kg MS)

Bolota	C25	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33	C35	C36
Bolota inteira	17,47	46,54	16,85	80,90	8,65	9,03	5,25	5,14	0,00	3,48
Miolo de bolota	12,35	14,96	11,79	18,68	7,19	5,97	5,42	4,61	0,00	3,50
Casca de bolota	29,66	162,64	36,34	366,63	9,34	16,64	3,12	4,35	0,00	0,00

Tabela 11 – Composição em n-alcenos da erva (mg/kg MS)

	C25	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33	C35	C36
Folha de leguminosas (I,II)										
Leguminosas I, II	57,96	148,23	21,93	166,84	10,05	19,14	3,97	4,24	0,00	0,00
Gramíneas I, II	62,96	46,52	16,26	68,22	10,81	38,00	1,79	17,65	2,88	3,12
Outras I	19,10	27,66	15,02	107,35	10,89	32,42	5,41	9,73	0,00	2,65
Outras II	26,07	43,23	17,71	143,60	12,93	44,78	8,64	15,46	5,02	3,89
Folha de gramíneas (III,IV)										
Leguminosas III,IV	24,25	47,05	17,54	119,02	8,94	31,42	4,19	11,03	0,00	0,00
Gramíneas III,IV	26,21	42,00	19,71	183,66	17,99	197,06	10,40	61,13	3,38	3,92
Outras III	25,88	44,08	15,81	130,87	17,76	148,45	12,59	79,25	20,59	3,10
Outras IV	26,58	44,41	18,46	167,19	14,42	76,75	7,21	28,09	0,00	0,00

A análise dos quadros permite confirmar as diferenças de concentração entre os n-alcenos de cadeia carbonada ímpar e par, apresentando os ímpares, valores bastante superiores, como seria de esperar, de acordo com Dove e Mayes (1991). Dos n-alcenos naturais presentes na dieta dos animais, o C27, C29 e o C31 apresentam-se em maior quantidade, especialmente na erva, ao passo que o C35 ocorre em muito baixas ou mesmo nulas concentrações. É também visível que na bolota, as concentrações de n-alcenos são relativamente baixas quando comparadas com a erva. As maiores concentrações de n-alcenos na bolota ocorrem na casca, pois é aqui que se encontra a cutícula cerosa.

O alcano externo C32 (em solução), foi pulverizado em bolota moída que foi depois dividida em doses individuais a fornecer aos animais resultando numa dose diária de 118 mg.

- **Ingestão, produção fecal e digestibilidade da dieta (bolota e erva) ingerida por porcos Alentejanos (ensaio *in vivo*)**

Na tabela 12 apresentam-se os valores da ingestão de bolota e erva, excreção fecal, digestibilidade da matéria orgânica e ingestão, excreção e digestibilidade da proteína bruta.

Tabela 12 – Ingestão e digestibilidade da MO e PB (média \pm desvio padrão) dos animais alimentados com bolota tratada e não tratada com PEG e com acesso a duas pastagens diferentes

	Pastagem				Significância		
	Trevo		Azevém		Pasto	PEG	Interacção
	com PEG	sem PEG	com PEG	sem PEG			
Bolota Ingerida (KgMO/dia)	3.2 $\pm 0,362$	2.81 $\pm 0,267$	2.78 $\pm 0,170$	2.87 $\pm 0,433$	0,237	0,297	0,120
Ingestão Estimada de Erva (KgMO/dia)	0.12 $\pm 0,208$	0.12 $\pm 0,160$	0.41 $\pm 0,228$	0.20 $\pm 0,226$	0,065	0,272	0,654
Ingestão de MO (KgMO/dia)	3.32 $\pm 0,441$	2.93 $\pm 0,287$	3.19 $\pm 0,320$	3.06 $\pm 0,253$	0,979	0,099	0,382
Produção Fecal (KgMO/dia)	1.15 $\pm 0,348$	0.82 $\pm 0,222$	1.20 $\pm 0,302$	0.98 $\pm 0,198$	0,415	0,040	0,657
Dig MO (%)	65.47 $\pm 8,25$	71.63 $\pm 7,85$	62.84 $\pm 5,83$	67.84 $\pm 6,31$	0,329	0,099	0,858
Ingestão de PB (Kg/dia)	0.231 $\pm 0,055$	0.202 $\pm 0,036$	0.231 $\pm 0,034$	0.207 $\pm 0,013$	0,881	0,140	0,871
PB média nas fezes (g/KgMO)	224.81 $\pm 36,04$	291.35 $\pm 39,49$	203.22 $\pm 8,39$	304.60 $\pm 44,37$	0,793	0,000	0,282
Excreção de PB (Kg/dia)	0.251 $\pm 0,045$	0.235 $\pm 0,047$	0.243 $\pm 0,055$	0.292 $\pm 0,014$	0,619	0,207	0,699
Dig PB (%)	-11.60 $\pm 25,27$	-16.19 $\pm 11,52$	-4.22 $\pm 10,46$	-40.95 $\pm 4,21$	0,213	0,007	0,029

NS – não significativamente diferente para $P < 0,05$

* - $p = 0,065$

As quantidades de bolota ingerida foram elevadas em todos os tratamentos, correspondendo a cerca de 5,9kg de bolota fresca por dia, valores coerentes com aquilo que foi apontado por Dobao *et al* (1988) e Rodriguez-Estévez *et al* (2008).

A quantidade estimada de erva ingerida variou bastante entre tratamentos, apresentando o valor mais elevado no tratamento de azevém e bolota com PEG, onde representou 12,9% da dieta ingerida, e o mais baixo no trevo e bolota com PEG (3,6% da dieta). Verificou-se ainda uma grande variabilidade dentro de cada tratamento,

particularmente para a estimativa da ingestão de erva, o que está bem expresso nos desvios padrões da média muito elevados. Esta variabilidade pode estar muito ligada a comportamentos alimentares dos animais muito díspares no que diz respeito quer à ingestão de miolo e casca de bolota quer às actividades de pastoreio. A média de ingestão de erva nos 4 tratamentos correspondeu a cerca de 1,35kg de erva fresca. A ingestão de erva pode ter sido condicionada pela elevada ingestão de bolota. Nas pastagens de gramíneas houve uma tendência ($p=0,065$) para uma maior ingestão de erva. Esta, para além de contribuir para um aumento da ingestão de proteína, também contribuiu para um aumento da ingestão de fibra o que poderá ter tido alguma influência negativa na digestibilidade da matéria orgânica.

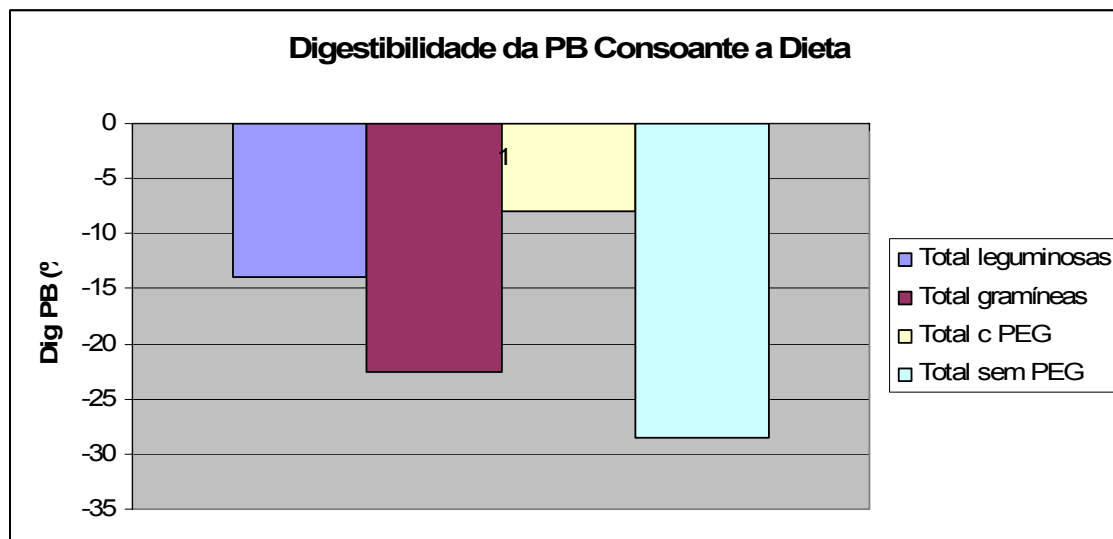
Podemos observar que houve uma excreção fecal superior nos porcos tratados com PEG que poderá ser devido a algum efeito deste sobre o trânsito intestinal ou sobre alguma das fracções do alimento. Já Makkar *et al.* (1995) e Palmer e Jones (2000) referem o facto do PEG bloquear alguns componentes da dieta promovendo a sua precipitação e excreção, contribuindo assim para uma diminuição da digestibilidade da matéria orgânica da dieta.

Como consequência da maior excreção fecal nos tratamentos com PEG também se observa uma tendência para uma digestibilidade da matéria orgânica mais baixa, pelo que o PEG parece ter um efeito, se bem que não significativo, adverso à digestibilidade da matéria orgânica, indo de acordo com aquilo que, tanto Salawu *et al.* (1997), como Jones *et al.*, (2000), concluíram, dizendo que a adição de PEG por vezes não corresponde a um incremento da digestibilidade da matéria orgânica tão grande como se esperava, tendo até, por vezes, um efeito negativo. Os animais sujeitos aos tratamentos das pastagens de trevo apresentam uma digestibilidade da matéria orgânica (68,55%) ligeira, mas não significativamente, acima das das pastagens com azevém (65,34%) o que se pode justificar pela maior ingestão de erva.

A ingestão de proteína bruta foi semelhante em todos os tratamentos, embora ligeiramente mais elevada nos tratamentos com PEG. Ao contrário do esperado, um aumento da ingestão da erva não correspondeu a um aumento da ingestão da proteína bruta, pois aquele foi sempre acompanhado por uma menor ingestão de bolota com uma perda de azoto semelhante ao introduzido pela erva. Podemos considerar os valores de ingestão de proteína bruta baixos para porcos de raça gorda, com um peso médio de 90kg e um ganho médio diário de 600g para os quais são apontados valores à volta de 320g de proteína bruta por dia (INRA, 1984). Na verdade

as dietas apresentavam uma concentração média de proteína bruta na matéria orgânica de 7% o que é manifestamente baixo mesmo para porcos em manutenção.

Figura 7 – Digestibilidade da proteína bruta consoante o tratamento



Quanto à digestibilidade da proteína bruta verificámos que foi negativa em todos os tratamentos. Isto só é possível quando a quantidade de azoto metabólico fecal for superior à proteína digestível da dieta o que faz com que os porcos excretem mais azoto do que aquele que ingerem. Na verdade o azoto metabólico fecal tende, para numa determinada dieta, apresentar uma taxa constante que em porcos oscila entre 1,1 e 1,5g de N por 100g de matéria seca fecal (Delage, 1969), o que faz com que a digestibilidade aparente da proteína bruta seja particularmente dependente da proporção da proteína da dieta que, como já vimos, foi bastante baixa. Este facto associado ao efeito dos taninos contribuiu certamente para as digestibilidades negativas determinadas.

O tipo de pastagem não influenciou a digestibilidade da proteína bruta porque o aumento da ingestão de erva não correspondeu a um aumento da ingestão da proteína bruta, como já comentámos anteriormente, embora seja de referir que o tratamento 3, onde se observou a maior ingestão de erva também foi aquele que apresentou uma digestibilidade da proteína bruta menos negativa. A interacção significativa entre tipo de pastagem e PEG pode ter confundido o efeito da pastagem. Por outro lado, quanto ao efeito do PEG, verifica-se uma redução significativa da negatividade da proteína bruta. Esta melhoria da digestibilidade da proteína bruta pode-se dever a uma ingestão de proteína bruta ligeiramente superior mas sobretudo a uma menor excreção de proteína bruta por efeito do PEG, tal como foi referido por

Ben Salem *et al* nos seus trabalhos de 2000 e 2002 e por Getachew *et al* (2001), segundo os quais, devido à capacidade deste composto em deslocar os taninos das ligações já feitas com as proteínas, voltando, estas, a estar disponíveis para serem hidrolisadas pelas enzimas e, posteriormente, absorvidos os produtos dessa digestão.

É ainda importante referir que as digestibilidades da proteína bruta foram calculadas com base em estimativas da ingestão de erva e produção fecal feitas pela técnica dos n-alcanos. Esta é uma técnica correntemente utilizada para estimativa da composição da dieta, ingestão e digestibilidade em ruminantes, mas ainda com pouco trabalho realizado em porcos. Uma das fragilidades da aplicação desta técnica a porcos prende-se com o facto das recuperações fecais de n-alcanos em porcos Alentejanos terem sido apenas determinadas para níveis de ingestão muito baixos (Ribeiro *et al*, 2007). Acresce ainda que o teor de n-alcanos na bolota é baixo (tabela 10), o que pode complicar a estimativa da composição da dieta. Assumindo que um dos problemas se encontra relacionado com as recuperações fecais dos n-alcanos, podemos considerar que, havendo erros na estimativa da digestibilidade, estes são cometidos, em todas as determinações, no mesmo sentido.

4) Comparação entre a estimativa de digestibilidade da proteína bruta *in vitro* e a digestibilidade da proteína bruta calculada no ensaio *in vivo*

Para se poder estabelecer uma relação entre estas duas formas de estimativas da digestibilidade da proteína bruta, neste caso, em porcos alentejanos, deve-se ter em atenção que quando falamos em digestibilidade *in vitro*, estamos a falar duma estimativa da digestão ileal verdadeira e que não tem em conta o que diz respeito ao estado de desenvolvimento dos animais, bem como às possíveis variantes intrínsecas ao seu comportamento alimentar.

Quando se trata de digestibilidades *in vivo* estamos perante uma digestibilidade aparente, isto é, em que o azoto fecal não provém apenas do alimento mas também da descamação celular e dos enzimas digestivos e, consequentemente, subestimada no que diz respeito à digestibilidade da proteína alimentar. Esta é ainda afectada por comportamentos alimentares variáveis, como níveis de ingestão diferentes ou o facto dos animais não comerem só uma espécie de erva, ou de alguns comerem a bolota inteira, ao contrário do que é usual, que podem, por sua vez, provocar trânsitos intestinais diferentes. Estes factores podem, segundo Martínez e Moyano (2003), explicar a elevada variabilidade de resultados dos ensaios *in vivo*.

Por outro lado temos ainda de considerar que a quantidade de bolota ingerida foi alta, o que poderá ter levado a um trânsito digestivo seja consideravelmente mais

rápido e, conseqüentemente, que o tempo que os alimentos se encontram sujeitos à acção dos enzimas para, posteriormente, serem absorvidos, seja muito menor, logo, provocando uma descida da digestibilidade.

Assim sendo teremos de nos cingir à comparação de tendências.

O efeito do PEG na digestibilidade *in vitro* da proteína bruta é de um acréscimo de sensivelmente 17 pontos percentuais logo no nível mais baixo de adição de PEG, ao passo que *in vivo* temos diferenças nas medias de digestibilidade na ordem dos 20 pontos percentuais (fig.7), valores que podem ser considerados da mesma ordem de grandeza.

Da mesma forma podemos comparar a digestibilidade consoante a pastagem em causa. Também neste caso há uma tendência para que, no ensaio *in vivo*, a digestibilidade da proteína bruta seja superior no caso da pastagem à base de leguminosas (-13,9% versus -22,6%), sendo, no entanto, muito semelhantes no caso da estimativa *in vitro*, para valores semelhantes de proteína bruta na mistura. Provavelmente, e apesar da quantidade de matéria orgânica ingerida ter sido muito semelhante, a maior quantidade de erva consumida no caso da pastagem à base de gramíneas pode ter aumentado a velocidade do trânsito digestivo. A situação acima referida confirma a redução da digestibilidade da matéria orgânica e é um factor não considerado na estimativa *in vitro*.

V. Conclusões

Com a realização deste trabalho podemos confirmar o efeito negativo dos taninos da bolota sobre a digestibilidade, real e aparente, da proteína da dieta. Quer no ensaio *in vitro* quer no *in vivo*, a adição de PEG à bolota induziu um aumento significativo da digestibilidade da proteína bruta. Contudo a utilização do PEG na montanhaira parece-nos muito difícil pois a bolota não cai todo ao mesmo tempo e encontra-se muito dispersa no solo, inviabilizando, por exemplo, a aspersão de uma solução.

Por outro lado, com as incubações de misturas de miolo de bolota com trevo e azevém, verificámos que a proteína do miolo da bolota é provavelmente suficiente para bloquear os seus próprios taninos, não se notando o seu efeito sobre a proteína presente nestas duas espécies de erva. A introdução das forragens fez aumentar as digestibilidades *in vitro* da proteína bruta de uma forma proporcional ao aumento da percentagem de proteína bruta da mistura e à digestibilidade da proteína das forragens. Esta foi diferente entre as forragens testadas, apresentando o trevo encarnado uma digestibilidade *in vitro* da proteína bruta superior à do azevém, 92,1% e 79,7% respectivamente.

No ensaio em pastoreio verificou-se que a ingestão estimada de erva variou bastante (média de 1,35kg de erva fresca), havendo uma tendência para uma maior quantidade nos tratamentos onde predominavam as gramíneas. Ao aumento da ingestão de erva correspondeu uma diminuição da ingestão de bolota, possivelmente porque os porcos estariam no máximo da sua capacidade de ingestão. Por esta razão o aumento de ingestão de proteína não foi tão acentuado como era esperado pois perdeu-se alguma proteína fornecida pela bolota.

A ingestão de proteína bruta em todos os tratamentos foi baixa, não ultrapassando os 7,2% da matéria orgânica, o que resultou num balanço digestivo negativo do azoto com a correspondente digestibilidade negativa. Assim os porcos estavam num balanço energético positivo, devido à ingestão de bolota muito rica em amido, e apresentavam digestibilidades da proteína bruta negativas, situação alimentar muito favorecedora de grandes deposições de gordura e fraco ou nenhum crescimento muscular, muito semelhante ao que podemos encontrar em porcos na montanhaira.

Ao contrário daquilo que esperávamos, parece-nos que os porcos não procuraram ingerir alimentos com teores de proteína mais elevados que pudessem contribuir para um balanço digestivo do azoto mais equilibrado e uma maior atenuação

do efeito dos taninos, como podemos observar no ensaio *in vitro*. Esta tendência é tanto mais importante quando verificamos que o teor de proteína bruta médio da dieta destes animais se situa abaixo do necessário, mesmo para porcos em manutenção.

É ainda de referir que a ingestão de proteína foi calculada a partir da composição da dieta e do teor em proteína bruta dos diversos grupos de plantas considerados, tendo sido aquela estimada a partir da comparação do perfil de n-alcanos excretados com os das famílias de gramíneas, leguminosas e outras, não tendo sido possível distinguir espécies dentro de cada grupo nem partes das plantas. Ora, se os porcos realizaram um pastoreio selectivo, dando preferência a algumas espécies dentro dos grupos considerados e ou a folhas em detrimento de caules, poderão ter ingerido uma dieta mais rica em proteína do que a estimada, introduzindo assim algum erro no cálculo da digestibilidade da proteína, subestimando-a. Há ainda que realçar que as digestibilidades da proteína foram calculadas a partir das estimativas da ingestão de erva e produção fecal feitas pela técnica dos n-alcanos. Esta técnica tem sido pouco aplicada em porcos e os únicos valores de recuperação fecal de n-alcanos em porcos Alentejanos de que dispúnhamos foram determinados para níveis de ingestão muito baixos (Ribeiro *et.al.*, 2007). A utilização de valores de recuperação fecal superiores aos reais resultaria numa sobre estimação da excreção fecal e numa subestimação da digestibilidade.

VI. Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, J. A., 1986. Influencia dos taninos de frutos de *Quercus ilex* L. e *quercus suber* L. sobre a fermentação retículo – ruminal e a digestão enzimática das proteínas. Tese de doutoramento. Universidade de Évora.
- AUSTIN, P.J., SUCHAR, L.A., ROBBINS, C.T., HAGERMAN, A.E., 1989. Tannin-Binding Proteins in Saliva of Deer and Their Absence in Saliva of Sheep and Cattle. Journal of Chemistry Ecological **15**, 1335.
- A.O.A.C., 1990. Protein (Crude) in Animal Feed: Combustion Method (990.03). Official Methods of Analysis. 15th Edition. USA.
- BASTIANELLI, D., SAUVANT, D., R'ERAT, A., 1996. Mathematical modeling of Digestion and Nutrient Absorption in Pigs. Journal of Animal Science, **74**, 1873.
- BATE - SMITH, E. C., 1973. Haemanalysis of Tannins: The Concept of Relative Astringency. Phytochemistry, **12**, 907.
- BEN SALEM, H., NEFZAOU, A., BEN SALEM, L., TISSERAND, J.L., 2000. Deactivation of condensed tannins in *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage by polyethylene glycol in feed blocks. Effect on feed intake, diet digestibility, nitrogen balance, microbial synthesis and growth by sheep, Livestock Production Science, **51**.
- BEN SALEM, H., ATTI, N., PRIOLO, A., NEFZAOU, A., 2002. Polyethylene glycol in concentrate or feed blocks to deactivate condensed tannins in *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage. 1. Effects on intake, digestion and growth by Barbarine lambs, Animal Science, **17**, 127.
- BENITO, J., 1996. Las Bases de la Exploración Extensiva. El Cerdo Ibérico. Zootecnia. Bases de Producción Animal **VI**, 315. Mundiprensa, Madrid.
- BENNICK, A., MCLAUGHLIN, A.C., GREY A.A., MADAPALLIMATTAM, G., 1981. The Location and Nature of Calcium-Binding Sites in Salivary Acidic Proline-Rich Proteins. Journal of Biology Chemistry, **25**:4741, 6.

BOISEN, S., 2007. A New Concept for Practical Feed Avaluation Sistems. Report from Research Center Foulum, Department of Animal Health, Welfare and Nutrition, Faculty of Agricultural Science, Denmark, 69pp.

BOISEN, S.;FERNANDEZ, J.A., 1995. Prediction of the Apparent Ileal Digestibility of Protein and Amino Acid in Feedstuff and Feed Misture for Pigs by *In Vitro* Analisis. Animal Feed Science and Technology, 51, 29.

BOVOLENTA, S., PIASENTIER, E., MALOSSINI, F., 1994. N- Alkanes as Markers in Feeding Trials. Departement of Animal Production Science University of Udine.

BUXADÉ, C., 1984. Ganado Porcino. Mundi Prensa.

CAI, K., HAGERMAN, A.E., MINTO, R.E., BENNICK, A., 2006. Decreased Polyphenol Transport Across Cultured Intestinal Cells by a Salivary Proline-Rich Protein. Biochemical Pharmacology, 71,1570.

CANCELA d'ABREU, M. (1992). Valor Alimentar de Três Pastagens Anuais Para Ovinos. Tese de doutoramento. Universidade de Évora.

CANTOS, E., ESPÍN, J.C., LÓPEZ-BOTE, C., DE LA HOZ, L., ORDÓÑEZ, J.A., TOMÁS-BARDERÁN, F.A., 2003. Phenolic Compounds and Fatty Acids Acorns (*Quercus spp.*), the Main Dietary Constituent of Free-Ranged Iberian Pigs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 6248.

DAZA, A., 1996. El Sector Porcino Ibérico-I. Mundo Ganadero, 83,173.

DELAGE, J., 1969. L' alimentation azotee. Chaire de Zootechnie. I.N.A., France, 106.

DOBAO, M.T., RODRIGAÑEZ, J., SILIO, L., TORO, M.A., 1988. Iberian Pig Production in Spain. Pig news inf., 9, 277.

DOVE, H., MAYES, R.W., 1991. The Use of Plant Wax Alkanes as Marker Substances in Studies of Nutrition of Herbivores: A Review. Australian Journal of Agriculture Research, 42, 913.

DOVE, H., MAYES, R.W., 1996. Plant Wax Components: A New Approach to Estimating Intake and Diet Composition in Herbivores. American Institute of Nutrition.

DOVE, H., MAYES, R.W., 2003. Analysis of n-Alkanes- Extraction of Faeces and Herbage. Satellite Meeting: Wild and Domestic Herbivore Diet Characterization, 17-19 Outubro 2003, 10.

DOVE, H., MAYES, R.W., 2006. Protocol for the analysis of n-alkanes and other plant-wax compounds and for their use as markers for quantifying the nutrient supply of large mammalian herbivores. Nature Protocols, vol1, 3.

FERRAZ DE OLIVEIRA, M.I., TRIGO, A.P., NEVES, J.A., CANCELA d'ABREU, M., 2006. Validation of the N- Alkanes Technique to Measure Intake and Digestibility in Alentejano Pigs Under "Montanheira". In: Sandoval-Castro, C.A; Hovell, F.D. DeB; Acosta, F.T.; Ayala-Burgus, A.(eds), Herbivores, the assessment of intake, digestibility and the roles of secondary compounds. Nottingham University Press, UK, 55

GARCIA, M., 1982. El Cerdo Ibérico. Simposio "El Ecosistema Extremeño: la Dehesa, el Encinar y el Cerdo Ibérico". Carcesa-Apis, 9.

GETACHEW, G., MAKKAR, H.P.S., BECKER,K.,2001. Method of Polyethylene Glycol Application to Tannin-Containing Browses to Improve Microbial Fermentation and Efficiency of Microbial Protein Synthesis from Tannin-Containing Browses. Animal Feed Science and Technology,92, 51.

GOERING, H.K., VAN SOEST, P.J., 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures and some applications). Agronomy Handbook 379, U.S.D.A.

GOLDSTEIN, J.L.; SWAIN,T., 1965. The Inhibition of Enzymes by Tannins. Phytochemistry,4, 185.

HAGERMAN, A.E.,1992. Tannin-Protein Interactions. Phenolic Compounds in Food and Health, 236.

HAGERMAN, A.E, BUTLER, L.G., 1981. Specificity of Proanthocyanidin-Protein Interactions. Journal of Biology Chemistry, 256, 4494.

HAGERMAN, A.E., ROBBINS, C.T., 1993. Specificity of Tannin-Binding Salivary Proteins Relative to Diet Selection by Mammals. Canadian Journal of Zoology, 71, 628.

HARBORNE, J.B., 1991. The Chemical Basis of Plant Defense. Plant Defenses Against Mammalian Herbivory, 45.

HASLAM, E., 1977. Symmetry and Promiscuity in Proanthocyanidin Biochemistry. Phytochemistry, 16, 1625.

HASLAM, E., 1980. Vegetable tannins. Department of Chemistry, Sheffield University, Sheffield S3 /HF, United Kingdom.

HAY, D.I., MORENO, E.C., SCHLESINGER, D.H., 1979. Phosphoprotein Inhibitors of Calcium Phosphate Precipitation in Human Saliva. Inorganic Perspective of Biology Medicine, 2:271, 85.

INRA, 1984. L'Alimentation des Animaux Monogastriques: Porc, Lapin, Volailles. Ed. Jean-Claude Blum, França, 282.

JONES, E.T.; MANGAN, J.L., 1977. Complexes of the Condensed Tannins of Sanfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) With Fraction I Leaf Protein and with Submaxillary Mucoprotein and Reversal by Polyethylene Glycol and pH. Journal of the Science of Food Agriculture, 28, 126.

JONES, R.J., MEYER, J.H.F., BECHEZ, M., STOLTZ, M.A., 2000. An Approach to Screening Potential Pasture Species for Condensed Tannin Activity. Animal Feed Science and Technology, 85, 269.

JUNTHEIKKI, M.R., JULKUNEN-TIITTO, R., HAGERMAN, A.E., 1996. Salivary Tannin-Binding Proteins in Root Vole (*Microtus oeconomus* Pallas). Biochemical Systematics and Ecology, 24, 25.

KAUFFMAN, D.L., KELLER, P.J., 1979. The Basic Proline-Rich Proteins in Human Parotid Saliva From a Single Subject. Arch Oral Biology, 24, 249.

LEÓN CRESPO, F., 1992. Optimización de los Parámetros de Calidad de Jamón de Cerdo Ibérico. El Cerdo Ibérico, la naturaleza, la dehesa, 245, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.

LOPEZ-BOTE, C.J., 1998. Sustained Utilization of the Iberian Pig Breed. Meat Science, 49, 17.

LUCK, G., LIAO, H., MURRAY, N.J., GRIMMER, H.R., WARMINSKI, E.E., WILLIAMSON, M.P., LILLEY, T.H., HASLAM, E., 1994. Polyphenols, Astringency and Proline-Rich Proteins. Phytochemistry 37, 357.

MAKKAR, H.P.S., BLUÈMMEL, M., BECKER, K., 1995. Formation of Complexes Between Polyvinyl Pyrrolidones or Polyethylene Glycols and Tannins, and Their Implication in Gas Production and True Digestibility in *In Vitro* Techniques. British Journal of Nutrition, 73, 897.

MARTIN, J.S., MARTIN M.M., 1983. Tannin Assays in Ecological Studies. Precipitation of Ribulose-1,5-Biphosphate Carboxylase/Oxygenase by Tannic Acid, Quebracho and Oak Foliage Extracts. Journal of Chemistry Ecology 9, 285).

MARTIN, M.M., ROCKHOML, D.C., MARTIN, J.S., 1985. Effects of Surfactants, pH and Certain Cations on Precipitation of Proteins by Tannins. Journal of Chemistry Ecology, 11, 485.

MARTÍNEZ, T.F., MOYANO, F.J., 2003. Effect of Tannic Acid on *In Vitro* Enzymatic Hydrolysis of Some Protein Sources. Journal of the Science of Food and Agriculture, 83, 456.

MAYES, R.W., DOVE, H., CHEN, X., B., GUADA, J., A., 1995. Advances in the Use of Faecal and Urinary Markers for Measuring Diet Composition, Herbage Intake and Nutrient Utilization in Herbivores. Recent Developments in the Nutrition of Herbivores Proceedings of the IVth International Symposium on the Nutrition of Herbivores. INRA Editions, Paris, 381.

MAYES, R.W., DOVE, H., 2000. Measurements of Dietary Nutrient Intake in Free-Ranging Mammalian Herbivores. Nutrition Research Reviews, 13, 107.

MAYES, R.,W., LAMB, C.,S., COLGROVE, P.,M., 1986. The Use of Dosed and Herbage n- Alkanes as Markers for the Determination of Herbage Intake. Journal of Agricultural science, **107**, 161.

MAYORAL, A.I., 1994. El Crescimiento de la Canal Porcina Ibérica: Estúdio Anatomodescriptivo y Consideraciones Aplicadas. Doctoral theses, Facultad de Veterinária. Universidad de Extremadura.

MCDONALD, P., EDWARDS, R.A., GREENHALGH, J.F.D., MORGAN, C.A., 2002. Animal Nutrition, **6**. Pearson Education Edt., UK, 693.

MEHANSHO, H., BUTLER, L. G., CARLSON, D. M., 1987. Dietary Tannins and Salivary Proline-Rich Proteins: Interactions, Induction and Defense Mechanisms. Nutrition Research Reviews, **7**, 423.

MENDES, C., FERRAZ DE OLIVEIRA, M. I., RIBEIRO, T., CANCELA d'ABREU, 2007. Estimativa da ingestão e digestibilidade de erva e bolota em porcos Alentejanos pela técnica dos n-alcenos. Revista de Ciências Agrárias, **30(1)**,198.

MOLE, S., WATERMAN, P.G., 1985. Stimulatory Effects of Tannins and Cholic Acid on Tryptic Hydrolysis of Proteins: Ecological Implications. Journal of Chemical Ecology, **11**,1323.

MORALES, J., PÉREZ, J.F., ANGUITA M, MARTÍN-ORÚE S., FONDEVILA M., GASA J., 2003. Comparación de Parámetros Productivos y Digestivos Entre Cerdos Ibéricos y Landrace Alimentados con Maíz o Bellota y Sorgo. Archivos de Zootecnia vol 52, 197, 37.

MOSENTHIN, R., SAUER, W.C.;AHRENS, F., 1994. Dietary Pectin's Effect on Ileal and Faecal Amino Acid Digestibility and Exocrine Pancreatic Secretions in Growing Pigs. Journal of Nutrition, **124**, 1222.

OLIVÁN, M., OSORO, K., 1997. Utilización de la Técnica de los n-Alcanos en Estúdios de Ingestión y Selección de Dieta de los Ruminantes en Pastoreo: Revisión. ITEA, vol 93^a, 3, 193.

PALMER, B., JONES, R.J., 2000. The Effect of PEG Addition *In Vitro* on Dry Matter and Nitrogen Digestibility of *Calliandra calothyrsus* and *Leucaena leucocephala* Leaf. Animal Feed Science and Technology, 85, 259.

PEREZ-MALDONADO, R.A., NORTON, B.W., KERVEN, G.L., 1995. Factors Affecting *In Vitro* Formation of Tannin–Protein Complexes. Journal of Science Food Agriculture, 69,291.

POVOAS JANEIRO, J., 1944. A suinicultura em Portugal. Boletim Pecuário, 2, Ano XII.

PRICE, M.L.; BUTLER, L.G. ,1980, Tannins and Nutrition. Station bulletin nº272. Department of Biochememistry, Agricultural Experiment Station, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA.

PUJOL, S., TORRALLARDONA, D., 2007. Evaluation of *In Vitro* Methods to Estimate the *In Vivo* Nutrient Digestibility of Barley in Pigs. Livestock Science, 109,186.

PUJOL, S., TORRALLARDONA, D., BOISEN, S., 2001. *In Vivo* and *In Vitro* Ileal Digestibility of Protein and Amino Acids in Barleys. Lindberg, J.E., Ogle, B. (Eds.), Digestive Physiology of Pigs, CABI Puplishing, Wallingford, UK, 344.

RIBEIRO, T., MENDES, C., FERRAZ DE OLIVEIRA, M. I., CANCELA d'ABREU, 2007. Estudo para a validação da técnica dos n-alcanos na estimativa da ingestão e da digestibilidade em porcos Alentejanos. Revista de Ciências Agrárias, 30(1),296.

RIVERA FERRE, M.G, EDWARDS, S.A., MAYES, R.W, 2001. The effect of season and level of concentrate on the voluntary intake and digestibility of herbage by outdoor sows. Animal Science, 72, 501.

RIVEST, J., BERNIER, J.F., POMAR, C., 2000. A Dynamic Model of Protein Digestion in the Small Intestine of Pigs. Journal of Animal Science, 78, 328.

SALAWU, M.B., ACAMOVIC, T., STEWART, C.S., HOVELL, F.D., De, B., MCKAY, I., 1997. Assessment of the Nutritive Value of Calliandra Calothyrsus: *In Sacco* Degradation and *In Vitro* Gas Production in the Presence of Quebracho Tannins With or Without Browse Plus. Animal Feed Science and Technology, 69, 219.

SANZ, E., OLMO, J.G., 2000. Quality Indexes for an Objective Classification of Iberian Pig Carcasses. I Conferência Virtual Internacional Sobre Qualidade da Carne Suína, 16 de Novembro a 16 de Dezembro de 2000.

SCHULTZ, J.C.; BALDWIN, I.T.; NOTHNAGLE, P.J., 1981. Hemoglobin as a Binding Substrate in the Quantitative Analysis of Plant Tannins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 29, 823.

SEHESTED, J., BREINHILD, K.K., SOEGAARD, K., VOGNSEN, L., HANSEN, H.H., FERNANDEZ, J.A., DANIELSEN, V., KRISTENSEN, V.F., 1999. Use of N-Alkanes to Estimate Grass Intake and Digestibility in Sows. Nutritional Ecology of Herbivores. Satellite Symposium: Emerging Techniques for Studying the Nutrition of Free Ranging Herbivores. Editors: Hugh Dove & S.W. Coleman. Texas

TAMIR, M.; ALUMOT, E., 1969. Inhibition of Enzymes by Condensed Tannins from Green and Ripe Carobs. Journal of the Science of Food and Agriculture, 20, 199.

TEJEDA, J.F., GARCIA, C., PETRÓN, M.J., ANDRÉS, A.I., ANTEQUERA, T., 2000. N- Alkanes Content of Intramuscular Lipids of Iberian Pigs Fresh Ham From Different Feeding Systems and Crossbreeding. Meat Science, Agosto 2000.

TIRAPICOS NUNES, J.L., 1993. Contributo para a reintegração do porco alentejano no montado. Tese de doutoramento. Universidade de Évora, 276.

TIRAPICOS-NUNES, J., 2005 Produção Pecuária no Montado – Suínos, Revista de Ciências Agrárias. Vol XXX, nº1 / Janeiro-Junho, 2007.

USRY, J.L., TURNER, L.W., STAHLY, T.S., BRIDGES, T.C., GATES, R.S., 1991. GI-Tract Simulation Model of the Growing Pig. Trans. Am. Soc. Agric. Eng., 34, 1879.

VAN BARNEVELD, R.J., 1999. Chemical and Physiological Characteristics of Grain Related to Variability in Energy and Amino Acid Availability in Pigs: a Review. Australian Journal of Agriculture Research 50, 667.

VAN MILGEN, J., NOBLET, J., VALANCOGNE, A., DUBOIS, S., DOORMAD, J.Y., 2005. Un Modele Pour Analyser les Performances et Evaluer les Strategies Alimentaires Chez le Porc en Croissance. J. Rech. Porcine Fr., 37, 291.

VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B., 1980. Systems of analysis for evaluating fibrous feeds. In: "Standardization of analytical methodology of feeds". Ed. W.J. Pridge, C.C. Balch, M. Graham, Int. Dev. Res. Cent., Ottawa, Canada, 49.

VAN SUMERE, C.F.; ALBRECHT, J.; DEDONDER, A.; DE POOTER, H.; PE, I., 1975. Plant Proteins and Phenolics. In: The Chemistry and Biochemistry of Plant Proteins. Eds: J.B. Harborne; C.F. Van Sumere. Academic Press, New York.

WEURDING, R.E., VELDMAN, A., VEEN, W.A.G., VAN DER AAR, P.J., VERSTEGEN, M.W.A., 2001. *In vitro* Starch Digestion Correlates Well With Rate and Extent of Starch Digestion in Broiler Chickens. J. Nutr., 131, 2336.

WILFART, A., JAGUELIN-PEYRAUD Y., SIMMINS H., NOBLET J., VAN MILGEN J., MONTAGNE L., 2007. Kinetics of Enzymatic Digestion of Feeds as Estimated By a Stepwise *In Vitro* Method, Animal Feed Science and Technology, 90, 231.

WILSON, H., SINCLAIR, A.G., HOVELL, F.D.DeB., MAYES, R.W., EDWARDS, S.A., 1999. Validation of the N-Alkanes Technique for Measuring Herbage Intake in Sows. Proceedings of the British Society of Animal Science, 177.

VII. Anexos

Preparação de reagentes

1) NaOH 1M

- Preparar a partir duma ampola (1L)
- Pesar 40,40g de NaOH para um balão de 1L e perfazer com água destilada

2) NaOH 0,6M

- Colocar 600 ml de NaOH 1M num balão de 1L e perfazer com água destilada

3) HCl 1M

- $N = (1,18 \times 0,35 \times 100) / 36,46$
 $N = 11,33$
 $V \times 11,33 = 1000 \times 1$
 $V = 88,26 \text{ ml}$
Medir 88,26 ml de ácido clorídrico 35% e perfazer para 1L com água destilada

4) HCl 0,1M

- Colocar 100 ml de HCl 1M num balão de 1L e perfazer com água destilada

5) HCl 0,2M

- Colocar 200 ml de HCl 1M num balão de 1L e perfazer com água destilada

6) Ácido sulfosalicílico 1%

- Colocar 1g de ácido sulfosalicílico concentrado e perfazer para 100ml com água destilada

7) Ácido sulfosalicílico 20%

- Colocar 20g de ácido sulfosalicílico concentrado e perfazer para 100ml com água destilada

8) Tampão fosfato 0,1 M pH 6,0

- Pesar:
1,2g/100ml Monosódio (3g/250ml) Merk 1148375 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
0,4g/100ml Disódio (1g/250ml) Merk A268179 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)

9) Tampão fosfato 0,2 M pH 6,8

- Pesar:
1,476g/100ml Monosódio (3,69g/250ml) Merk 1148375
($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
3,330g/100ml Disódio (8,325g/250ml) Merk A268179
($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)

10) Cloranfenicol

- Colocar 0,5g de Cloranfenicol e perfazer para 100ml de etanol

11) NaOH 4M

- Pesar 8g de NaOH e dissolver em aproximadamente 40ml de água destilada para, de seguida, com a ajuda dum balão volumétrico, acertar o volume para 50ml.

12) Tampão acetato 0,05M pH 5,0

- Pipetar 2,85ml de ácido acético glacial para um balão volumétrico de 1L com cerca de 800ml de água. Adicionam-se 10,6mg de ácido ascórbico e completa-se o volume com água destilada. Não esquecer de ajustar o pH para 5,0 com NaOH 4M